

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**Aplicaciones de la detección de las Glicoproteínas Mayoritarias de Superficie (MSG) de *Pneumocystis jirovecii***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA**

**ALUMNO/A: Nicole Stephanía Pesantes Sáenz**

**TUTOR/A: José Gadea**

**COTUTOR/A: Susana Ruiz Ruiz**

***Curso Académico: 2017-2018***

**VALENCIA, 06 de julio de 2018**

## Aplicaciones de la detección de las Glicoproteínas Mayoritarias de Superficie (MSG) de *Pneumocystis jirovecii*

*Pneumocystis* es un hongo ascomiceto oportunista que se adapta a la vida dentro de los pulmones de los mamíferos y puede causar neumonía severa en pacientes inmunocomprometidos aunque hay evidencias convincentes que sugieren que esta infección puede ser patogénica para ciertos grupos de edad infantil. Actualmente, el método generalmente aceptado para su detección es la amplificación por PCR anidada de una región del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad grande mitocondrial de *Pneumocystis*. Sin embargo, debido a sus limitaciones y riesgos considerables de contaminación se optimizó una real-time PCR, de ciclo único, basada en las principales glicoproteínas de superficie (MSG) de *Pneumocystis*, codificadas por una superfamilia multicopia exclusiva de genes relacionados pero distintos. Además, trabajos previos concluyen que son las proteínas más expresadas, encontrando de 64 a 179 genes únicos por especie.

Mi trabajo final de máster se ha centrado en las posibles aplicaciones de la detección de las MSG, como el desarrollo de una curva estándar para poder determinar el número de copias en diferentes tipos de muestras biológicas de niños y análisis de los resultados, el estudio de la variabilidad de las MSG y la detección de los ARN mensajeros de *Pneumocystis*, mtLSUr RNA y MSG RNA que podría relacionarse con pacientes con neumonía (PCP) y diferenciarse de los pacientes colonizados.

Palabras clave: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, Glicoproteínas mayores de superficie, real-time PCR.

## Applications of the detection of the Major Surface Glycoproteins (MSG) of *Pneumocystis jirovecii*

*Pneumocystis* is an opportunistic ascomycete fungi that adapts to life within the lungs of mammals and can cause severe pneumonia in immunocompromised patients although there is evidence to suggest that this infection may be pathogenic for certain childhood age groups. Currently, the generally accepted method for detection is nested PCR amplification of a region of the gene encoding the ribosomal RNA of the large mitochondrial subunit of *Pneumocystis*. However, due to its limitations and considerable risk of contamination, a single-cycle, real-time PCR was optimized, based on the major surface glycoproteins (MSG) of *Pneumocystis*, coded by an exclusive multicopy superfamily of related but different genes. In addition, previous studies conclude that they are the most expressed proteins, finding 64 to 179 unique genes per species.

My master's thesis was focused on the possible applications of MSG detection, such as the development of a standard curve to determine the number of copies in different types of biological samples of children and analysis of the results, the study of the variability of the MSG and the detection of the messenger RNAs of *Pneumocystis*, mtLSU rRNA and MSG RNA that could be related to patients with pneumonia (PCP) and differentiate from the colonized patients.

Key words: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, Major Surface Glycoproteins, real-time PCR.

ALUMNO/A: Nicole Stephanía Pesantes Sáenz

TUTOR/A: José Gadea

COTUTOR/A: Susana Ruiz Ruiz

Valencia, 06 de julio de 2018

## Agradecimientos

Al Dr. Andrés Moya, por confiar en mí una y otra vez y darme esta gran oportunidad.

A la Dra. Susana Ruiz, por ser mi mentora, por enseñarme y aconsejarme, por tenerme paciencia, por contestar mis preguntas una y otra vez, por poner mi bienestar sobre el suyo, por estar en las buenas, en las malas y sobre todo en las difíciles. Gracias Susana por ser más que sólo mi profesora.

A Gaby, por ayudarme y apoyarme y enseñarme, por estar ahí desde el primer día.

A Nurşah, por toda su ayuda dentro y fuera del laboratorio.

A Leo y Lore, por ser mi familia lejos de casa.

A mi familia, por su apoyo incondicional aún estando al otro lado del mundo.

A mis abuelos, por todo lo que han hecho por mí.

A mis padres y mis hermanos por ser las personas más importantes e influyentes en mi vida, por su esfuerzo y sacrificio. Sin ellos no estaría aquí.

A Dios.

# Contenido

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>HISTORIA Y TAXONOMÍA DE <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i>.....</b>	<b>1</b>
<i>Epidemiología</i> .....	2
<i>Microbiología</i> .....	3
<i>Genética</i> .....	3
<b>NEUMONÍA POR <i>PNEUMOCYSTIS</i> (PCP) .....</b>	<b>5</b>
<i>Prevalencia e incidencia de la enfermedad</i> .....	5
<i>Reservorio y transmisión</i> .....	7
<i>Clínica y tratamiento</i> .....	8
<i>Diagnóstico</i> .....	9
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>12</b>
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
2.1. <b>Muestras biológicas</b> .....	12
2.2. <b>Confirmación de la presencia de <i>Pneumocystis jirovecii</i></b> .....	12
2.3. <b>Confirmación de la presencia de <i>Pneumocystis jirovecii</i> con la detección de las principales glicoproteínas de superficie (MSG) mediante PCR a tiempo real.</b> .....	13
2.4. <b>Desarrollo de un método general para cuantificar el número de copias de MSG tipo A en biopsias de pulmón.</b> .....	13
3. <b>RESULTADOS</b> .....	14
3.1. <b>Confirmación de la presencia de <i>Pneumocystis jirovecii</i></b> .....	14
4. <b>DISCUSIÓN</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>23</b>
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	23
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
2.1. <b>DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FÚNGICA: AMPLICONES ITS</b> .....	23
2.2. <b>ANÁLISIS INFORMÁTICO: AMPLICONES ITS</b> .....	24
2.3. <b>CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE MUESTRAS CON BAJO NÚMERO DE LECTURAS DE <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i></b> .....	24
3. <b>RESULTADOS</b> .....	25
3.1. <b>OBTENCIÓN DE LA LIBRERÍA: AMPLICONES ITS</b> .....	25
3.2. <b>ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS LECTURAS.</b> .....	25
3.3. <b>CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE MUESTRAS CON BAJO NÚMERO DE LECTURAS DE <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i></b> .....	34
4. <b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>37</b>
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	37
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
2.1. <b>Muestras biológicas.</b> .....	37
2.2. <b>Extracciones de RNA.</b> .....	37
2.3. <b>RT-PCR convencional en un solo tubo.</b> .....	38
2.4. <b>RT-PCR cuantitativa a tiempo real.</b> .....	38
3. <b>RESULTADOS.</b> .....	38
3.1. <b>Detección de infección activa mediante RT-PCR convencional.</b> .....	38
3.2. <b>Detección de infección activa mediante RT-PCR a tiempo real.</b> .....	42
4. <b>DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>45</b>



## Introducción

### Historia y taxonomía de *Pneumocystis jirovecii*

Carlos Chagas (1879-1934) observó en 1909 a los microorganismos actualmente conocidos como *Pneumocystis* por primera vez (Coura, 2013). Fue durante su estudio de una nueva enfermedad que afectaba a los trabajadores de las vías del ferrocarril en Brasil. Chagas observó en los pulmones de cobayos que fallecían a los 5 días de ser inoculados con sangre de estos trabajadores que contenían un nuevo "tripanosoma" humano y lo interpretó como una parte del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Aliouat-Denis *et al.*, 2009). Un año después Antonio Carini (1872-1950), director del Instituto Pasteur de São Paulo, describió quistes similares en ratas infectadas con *Trypanosoma lewisi* y envió muestras de tejidos a Charles Louis Alphonse Laveran en el Instituto Pasteur en París. Dos discípulos de Laveran, el matrimonio Delanöe observaron los mismos quistes que Chagas y Carini habían descrito en los pulmones de ratas que no estaban infectados con tripanosoma (Calderón-Sandubete *et al.*, 2002). Fue entonces en 1912 cuando se determinó que los quistes observados por Chagas y Carini procedían de una nueva especie. Los Delanöe sugirieron el nombre *Pneumocystis carinii* para el nuevo organismo (*pneumo* por su tropismo por el pulmón, *cystis* por los quistes observados y *carinii* en honor a Antonio Carini por facilitarles las muestras histológicas) (Calderón-Sandubete, de Armas Rodríguez, & Capó de Paz, 2011).

Al no encontrarse ninguna evidencia de enfermedad causada por el organismo se perdió el interés en el mismo y durante las dos décadas siguientes las publicaciones médicas fueron escasas. Los estudios estaban orientados en la distribución del microorganismo en los animales. *Pneumocystis* se vio presente en una gran cantidad de mamíferos incluyendo ratas, cobayas, monos y conejos en Brasil, ratas y ratones en Gran Bretaña y ratones en Suiza (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011). Pero, en 1938 Ammich y Benecke identifican una neumonía que afectaba a niños prematuros y malnutridos de etiología desconocida, la cual se denominó neumonía intersticial de células plasmáticas. Esta enfermedad se convirtió en una epidemia en el centro de Europa durante la Segunda Guerra Mundial y los años que la siguieron, entre 1941 y 1949 más de 700 casos fueron descritos solamente en Suiza (Rivero, 2015). En 1942 *Pneumocystis* fue descrita como un patógeno humano por dos investigadores holandeses Van der Meer y Brug, quienes observaron al microorganismo en un infante de tres meses de edad y en dos casos de autopsia (Dhami & Cermakova, 2015). Después de una década, en 1952, Vanêk, Jírovec y Lukes observaron en los pulmones de 16 niños fallecidos por la neumonía intersticial de células plasmáticas al organismo y determinaron que *Pneumocystis* era el causante de esta forma de neumonía. Hasta 1956 se creía que la enfermedad afectaba únicamente en la infancia (Rivero, 2015).

Durante las décadas de 1960 y 1970 se empezaron a describir casos de neumonía en adultos y niños con malignidades hematológicas y durante la epidemia de VIH la prevalencia de la infección por *Pneumocystis* aumentó dramáticamente y se convirtió en una infección oportunista altamente reconocida capaz de causar neumonía severa y la muerte de pacientes inmunocomprometidos (Dhami & Cermakova, 2015). Las décadas de 1970 y 1980 fueron importantes para el estudio del patógeno ya que aparecieron los primeros estudios con anticuerpos aislados de suero de rata, en 1972 se observó que estos, que reaccionaban con *Pneumocystis* procedente de rata no reaccionaban con *Pneumocystis* obtenidos de humanos (Gigliotti, 2005). Es por eso que en 1976 Frenkel planteó la hipótesis de que la especie que infectaba a ratas y la que infectaba a humanos no era la misma a pesar de que morfológicamente no presentaban diferencias. En 1999 se cambió el nombre a *Pneumocystis jirovecii* en honor a parasitólogo checo Otto Jirovec, quien relacionó al patógeno con la neumonía en humanos (Stringer, Beard, Miller, & Wakefield, 2002).

Por sus características morfológicas, su resistencia a los antifúngicos clásicos y su respuesta al tratamiento con pentamidina, *Pneumocystis* fue durante muchos años considerado un protozoo

(Tabla 1). En 1953 Giese propone que el patógeno debía ser un hongo y que las descripciones de los pulmones de los pacientes infectados eran de esporas (Carmona & Limper, 2011). En 1970 Vavra y Kucera, basados en estudios ultra estructurales, sugieren nuevamente que el organismo es un hongo (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011). En 1988, gracias a los estudios del RNA de la subunidad ribosoma pequeña de *Pneumocystis* por Edman y colaboradores se logró finalmente la clasificación correcta del patógeno en el reino Fungi (Carmona & Limper, 2011). Además, se determinó que genes mitocondriales importantes como el de la subunidad mayor del RNA ribosomal de la mitocondria de *Pneumocystis* tienen una alta homología con aquellos genes de hongos. También se identificó un tercer factor de elongación de la síntesis proteica, el cual es necesario en hongos y está ausente en otros organismos y se determinó que las enzimas timidilato sintasa (TS) y dihidrofolato reductasa (DHFR), en *Pneumocystis* son diferentes mientras que en protozoos es una misma enzima con doble función (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Tabla 1. Características de *Pneumocystis* que comparten con los protozoos y hongos (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011)

Protozoos	Hongos
Ciclo de vida similar a los protozoos	La secuenciación de los cDNA de alrededor de 2 000 genes conservan homología con la secuencia de 1 412 genes homólogos en los hongos
Ausencia de algunas características fenotípicas de los hongos	Ausencia de estructura para la motilidad
Presencia de características morfológicas típicas de los protozoos	Ausencia de estructura para fagocitar
Inefectividad de los fármacos antifúngicos	Dificultad en obtener su cultivo
Efectividad de los fármacos empleados	Similitud con la pared celular de los hongos para tratar a los protozoos

Modificado de Sritangratanakul S, Nuchprayoon S, Nuchprayoon I. *Pneumocystis pneumonia: An Update*. J Med Assoc Thai. 2004;87(Suppl 2):S309-17.

Las especies de *Pneumocystis* están actualmente clasificadas en el reino Fungi, filo Ascomycota, clase Pneumocystidomycetes, orden Pneumocystidales y familia Pneumocystidaceae, todos estos únicos para *Pneumocystis*. Todas las especies del género son específicos de especie, y una forma diferente de *Pneumocystis* ha sido identificada en casi todos los mamíferos (C. F. J. Thomas & Limper, 2007).

## Epidemiología

*Pneumocystis jirovecii* es un hongo extracelular, oportunista, unicelular, no cultivable en medios sintéticos y tiene un marcado estenoxenismo, es decir, tiene una alta afinidad por su hospedero. Debido a su alto tropismo hacia el pulmón se encuentra de manera predominante en los alveolos, aunque ha sido encontrado en otros tejidos (Skalski, Kottom, & Limper, 2015).

La descripción del ciclo de vida de *Pneumocystis* no se ha logrado completar debido a la incapacidad de cultivar el hongo en ensayos *in vitro* en medios de cultivo tradicionales, sin embargo, se conoce que el organismo tiene tres formas morfológicas principales: las tróficas, las esporocíticas o prequiste y los quistes maduros (Figura 1) (Dhami & Cermakova, 2015). Entre cada forma trófica varían no solo el tamaño sino también la forma, el diámetro de la pared celular y la filopodia. Se considera a la forma trófica la forma más abundante en el ciclo de vida, representando entre el 90 y 95% de la población de *Pneumocystis* en el pulmón del paciente infectado (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

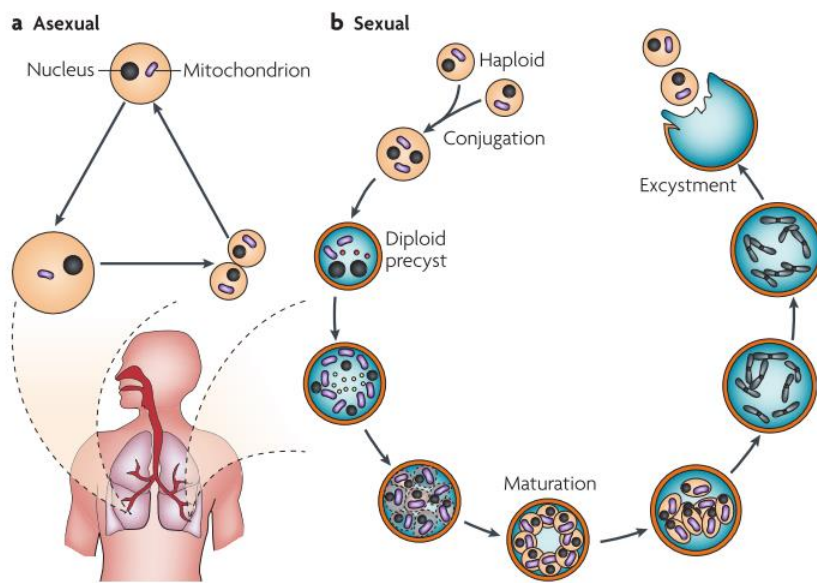


Figura 1. Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*. Se cree que la forma trófica puede formar un conjugado por fisión binaria y por tanto reproducirse asexualmente, además tiene un ciclo sexual, las formas tróficas son liberadas del quiste maduro cuando este se rompe, estas crecen vegetativamente o se conjugan para volver a formar el quiste maduro (C. F. J. Thomas & Limper, 2007).

## Microbiología

La incapacidad de cultivar de manera continua a *Pneumocystis in vitro* es el principal obstáculo para completar el conocimiento de la biología y la genética del organismo, impide la sincronización del crecimiento fúngico y la diferenciación de estadios *in vitro* (Aliouat-Denis *et al.*, 2009). El desarrollo de modelos animales con neumonía por *Pneumocystis* (PcP) ha ayudado y este método sigue siendo una fuente fiable para el estudio de la enfermedad y del organismo, de hecho, todos los tratamientos disponibles para PcP en humano han derivado del estudio de *P. carinii* en ratas y *P. murina* en ratones. Además, estos modelos ayudan a la visualización microscópica del organismo (Gigliotti, Limper, & Wright, 2014).

## Genética

Conocer el genoma de *Pneumocystis* podría ayudar a clarificar dudas sobre la biología del organismo y sobre su interacción con su hospedero. Recientemente, el genoma completo para tres especies de *Pneumocystis* que infectan a humanos (*P. jirovecii*), ratas (*P. carinii*) y ratones (*P. murina*) ha sido secuenciado por Ma y colaboradores en 2016. El genoma de *P. murina* y *P. carinii* son similares en su longitud total, estructura cromosómica y organización de los genes, estos además muestran reordenamientos génicos limitados, mientras que el genoma de *P. jirovecii* se encuentra altamente reorganizado (Figura 2). El ensamblaje del genoma de *P. jirovecii* tiene un tamaño de 8,4Mb y 20 cromosomas que varían en tamaño entre los 72 a 635kb (Ma *et al.*, 2016).



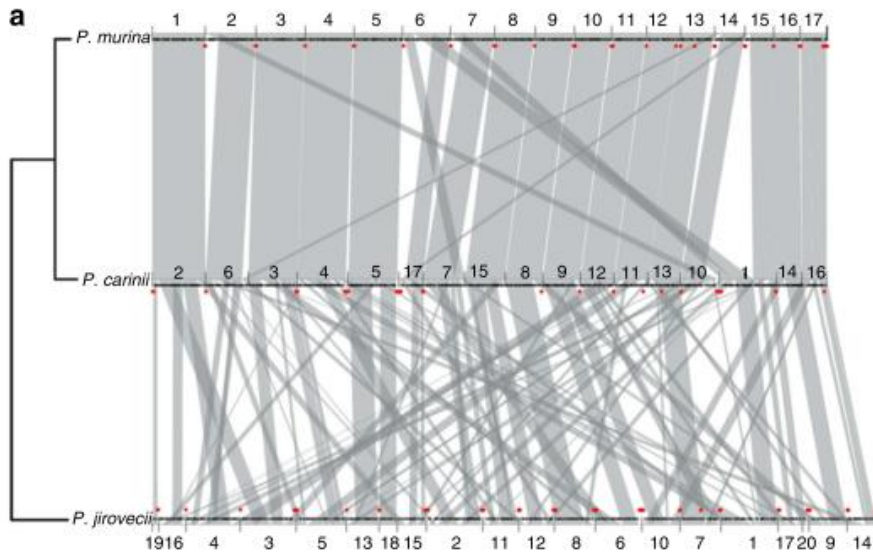


Figura 2. Sintenia conservada entre tres genomas de *Pneumocystis*. Las regiones sinténicas compartidas se representan con recuadros grises. Los números de scaffolds se enumeran en el eje x, y los puntos rojos indican la ubicación de los genes de glicoproteínas mayores de superficie (Msg) (Ma et al., 2016).

En comparación con otros hongos, las tres especies de *Pneumocystis* tienen un tamaño del genoma pequeño y un conjunto reducido de genes; entre 3.675 y 3.812 genes (incluido RNA de transferencia (ARNT) y RNA ribosómico (rRNA)) (Tabla 2) en comparación con un promedio de 5.044 genes en los cuatro genomas de *Schizosaccharomyces* relacionados (Ma et al., 2016).

Tabla 2. Comparación de *Pneumocystis* y otros genomas fúngicos relacionados (Ma et al., 2016).

Species*	Chromosomes or scaffolds (count)	Genome size (Mb)	GC content (%)	Protein coding genes (count)	Exons per gene (count)	tRNA genes (count)	rRNA genes† (count)	Intergenic distance (mean, bp)
<i>P. murina</i>	17	7.50	26.9	3623	6.08	47	5	423
<i>P. carinii</i>	17	7.66	33.2	3646	5.97	45	5	430
<i>P. jirovecii</i>	20	8.40	28.4	3761	5.78	46	5	483
<i>T. deformans</i>	394	13.36	49.5	4661‡	2.10	169	5	827
<i>S. pombe</i>	3	12.57	36.1	5155	1.99	174	~450	669
<i>S. cerevisiae</i>	16	12.07	38.3	5863	1.06	275	~560	515

rRNA, ribosomal RNA; tRNA, transfer RNA

\*Genome data sources are provided in Supplementary Table 2.

†Supplementary Note 3.

‡Total available from NCBI database (accessed 26 March 2015) though 5,735 are indicated in ref. 18.

Los dominios de proteína enriquecidos en *Pneumocystis* incluyen proteínas de interacción con el hospedador y proteínas de la superficie celular requeridas para funciones celulares básicas, aunque los dominios proteicos más abundantes en *Pneumocystis* son los dominios de las glicoproteínas mayoritarias de superficie (Msg) (Figura 3), representando alrededor del 3-6% del genoma en 64 a 179 genes Msg únicos por especie (Ma et al., 2016). Las proteínas Msg de *Pneumocystis* están codificadas por una superfamilia multicopia exclusiva de genes, relacionados pero distintos. *Pneumocystis* varía la expresión de las Msg para evadir los mecanismos de defensa del huésped (Emanuel Schmid-Siegert et al, 2017). Basado en la estructura del dominio y en el análisis filogenético, la superfamilia Msg se clasifica en cinco familias, designadas como familias Msg-A, -B, -C, -D y -E, siendo la familia Msg-A (clásicas) la más representada, por lo que se clasifica en tres subfamilias de Msg-A1, Msg-A2 y Msg-A3 (Ma, Cissé, & Kovacs, 2018).

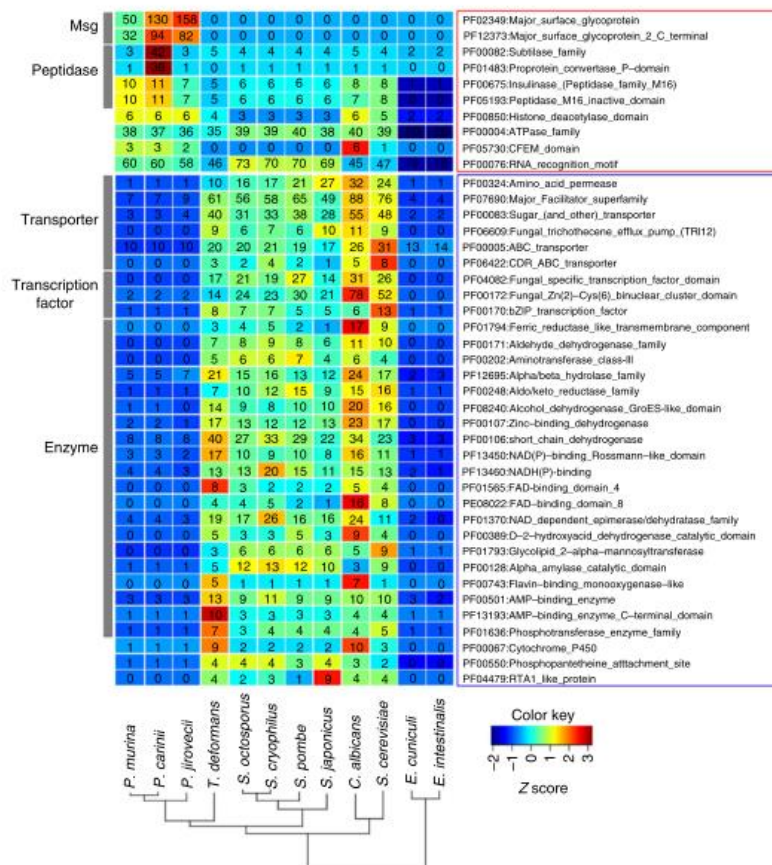


Figura 3. Dominios proteicos enriquecidos o reducidos en *Pneumocystis*. El panel superior muestra los dominios de familias proteicas significativamente enriquecidos, el panel inferior muestra aquellos que están significativamente reducidos (Test de Fisher, valor  $q < 0,05$ ) (Ma et al., 2016).

### Neumonía por *Pneumocystis* (PcP)

En 2012 más del 90% de las muertes relacionadas a hongos fueron resultado de infecciones con cuatro géneros: *Cryptococcus*, *Cándida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* (Brown et al., 2012).

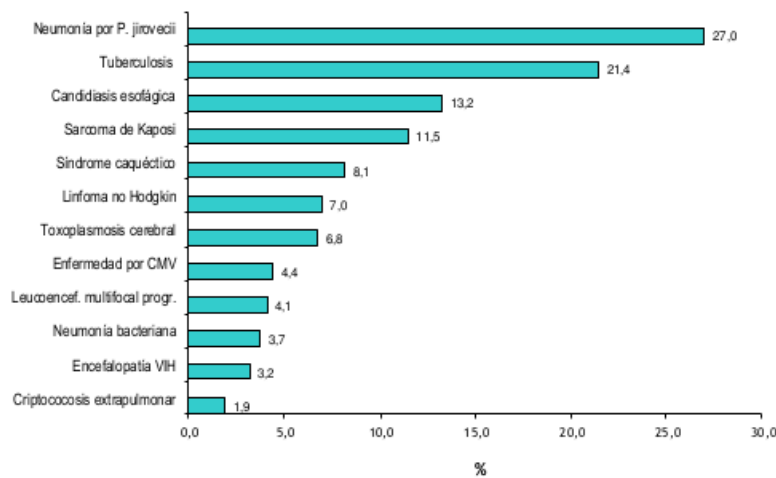
Al infectar los pulmones de su hospedero, *Pneumocystis* puede llegar a causar neumonía severa. En humanos, la PcP causada por *Pneumocystis jirovecii* puede ser mortal para pacientes inmunocomprometidos (Cissé et al., 2018).

### Prevalencia e incidencia de la enfermedad

Inicialmente la neumonía por *Pneumocystis* (PcP), hasta entonces llamada neumonía intersticial de células plasmáticas, se reportaba comúnmente en Europa en niños malnutridos en la época después de la segunda guerra mundial, en 1970 la infección por *Pneumocystis* era una complicación de la quimioterapia citotóxica utilizada para malignidades hematológicas (Hoving & Kolls, 2017). Durante la década siguiente, los pacientes con PcP estaban cursando con enfermedades o tratamientos que debilitaban su sistema inmune (Cushion, 2004), durante la pandemia del VIH la prevalencia de PcP aumento de manera dramática y se convirtió en la enfermedad definitiva más común en los países industrializados (Carmona & Limper, 2011).

PcP se considera una enfermedad indicadora de SIDA. Antes de la utilización de la profilaxis el 60% de los pacientes con SIDA se identificaron por presentar PcP (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011). En España entre los años 2010-2015 PcP fue la enfermedad definitoria de SIDA más frecuente (Figura 4) (ISCIII, 2016).

Se estima que pacientes con recuentos de linfocitos CD4+ menores a 200 células/mm<sup>3</sup> aumentan el riesgo de presentar la infección hasta en un 80% (de Boer, Walzer, & Mori, 2018; Dhami & Cermakova, 2015). La incidencia de PcP en países desarrollados ha experimentado una disminución progresiva desde que la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) está disponible, la incidencia descendió de 13 casos por cada 100 pacientes al año en 1994 a 3 casos por cada 100 pacientes en 1997 en Estados Unidos. De la misma manera, un estudio suizo determinó una disminución del 30% en la incidencia desde 1995 a 1997 (López-Sánchez *et al.*, 2015).



\* Por razones técnicas no se han podido incluir los casos de la C. Valenciana desde el año 2014 ni de Cataluña en 2015

Figura 4. Enfermedades definitorias de sida más frecuentes en España, periodo 2010-2015 (ISCIII, 2016)

Existen además otros grupos de riesgo asociados con inmunosupresión, hecho que le da una mayor importancia a la neumocistosis y a su estudio, sobre todo aquellos que tienen una reducción en los linfocitos CD4 o una disfunción de los linfocitos (Tabla 3). Estos pacientes VIH negativos son por lo general pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas, receptores de trasplantes y todos los pacientes que estén recibiendo tratamiento inmunosupresor (White, Backx, & Barnes, 2017). A pesar de avances en el diagnóstico y tratamiento, la PcP tiene una incidencia superior a 400,000 casos por año (Brown *et al.*, 2012) y un índice de mortalidad de entre el 5 y el 30% (Ma *et al.*, 2016), siendo estos datos mayores en pacientes VIH positivos.

Tabla 3. Resumen de los factores de riesgo para neumonía por *Pneumocystis* (White et al., 2017)

Underlying condition	Risk factor
HIV/AIDS <sup>a</sup>	CD4 count <200cells/ $\mu$ l, CD4 cell percentage <14%, Previous PcP, Oral candidiasis, Higher HIV burden, Ongoing bacterial pneumonia.
Hematological malignancy <sup>b</sup>	CD4 count <200cells/ $\mu$ l, Lymphocytopenia, Immunosuppression to prevent rejection of allogeneic hematopoietic SCT. For autologous SCT patients receiving purine analogs or high-dose corticosteroids. GVHD, ALL patients or those with lymphoproliferative disorders (CML, NHL, and multiple myeloma) as a result of chemotherapy including R-CHOP14, FCR, AVBD, gemcitabine or high-dose methotrexate. Monoclonal antibodies (e.g. rituximab).
Solid-organ transplantation <sup>c</sup>	CD4 count <200cells/ $\mu$ l, Corticosteroids, Antilymphocyte therapy, Mycophenolate mofetil, Calcineurin inhibitors, CMV disease, Graft rejection, Prolonged neutropenia, Exposure to cases of PcP.
Inflammatory disease	Administration of multiple ( $\geq 3$ ) immunomodulatory medications, including: calcineurin inhibitors and/or anti-TNF therapy. Corticosteroids.

Estudios serológicos y técnicas moleculares para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* han determinado que este organismo es probablemente uno de los agentes infecciosos contra los cuales los humanos se enfrentan más comúnmente, de hecho, la primera exposición al patógeno se da por lo general en los primeros años de vida (Rojas et al., 2017). Según estudios de España y Chile los niños de estos países tienen una seroprevalencia de 73 y 85% respectivamente (Calderón-Sandubete et al., 2011). Se ha descrito que, durante la gestación, el sistema inmune de la madre sufre cambios como una disminución de la respuesta de células Th-1 (producción de IFN- $\gamma$ ), un incremento en la respuesta humoral tipo Th-2 y un aumento de ciertas citoquinas como IL-4, IL-6 e IL-10 (Robinson & Klein, 2012) que predisponen a la colonización asintomática por *P. jirovecii*. Sin embargo, Vera y colaboradores determinaron que la madre no es la única fuente de infección para los recién nacidos, y que estos presentaron una mayor frecuencia de muestras positivas (Vera, Aguilar, Vélez, & Rueda, 2017). La hipótesis de que los niños colonizados con *P. jirovecii* podrían estar actuando como un reservorio para el microorganismo es interesante, la hipótesis está sustentada por el hecho de que a los 20 meses de edad el 85% de infantes presentan anticuerpos para el organismo (Calderón-Sandubete et al., 2011).

### **Reservorio y transmisión**

Se ha determinado que, a pesar de lo que se creía inicialmente, la infección por *Pneumocystis* no puede ser un producto de la zoonosis ya que existe una alta afinidad entre el microorganismo y su hospedero, además, la secuenciación del genoma del organismo ha descartado completamente la idea

de que los animales podrían ser reservorios para *Pneumocystis jirovecii* (Huang, 2011). Al eliminar la posibilidad de que el reservorio de *P. jirovecii* sean los animales la cuestión es determinar si es que existe un reservorio ambiental. Alrededor de 20 estudios se han centrado en la detección de ADN del hongo en muestras de agua y aire tanto en áreas rurales como en habitaciones de pacientes con PcP, donde el genotipo de *Pneumocystis* encontrado corresponde al genotipo presentado por el paciente (Ma *et al.*, 2018). A pesar de haber encontrado el ADN del organismo, la capacidad infectiva en estos ambientes sigue siendo cuestionada.

Se ha descrito la presencia del hongo en personas inmunocompetentes de diferentes grupos poblacionales, las cuales no presentan infección activa o sintomatología clínica, estas personas podrían ser reservorios temporales para el organismo y posibles transmisores del patógeno a individuos susceptibles, además, como se planteó anteriormente, el embarazo podría ser un factor de riesgo de la infección, convirtiéndose las madres en portadoras y potencialmente reservorios en la infección primaria infantil (Cushion, 2004; Iturra *et al.*, 2018).

Existen dos hipótesis sobre el modo de transmisión de *Pneumocystis*, la primera siendo la reactivación de una infección primaria latente o una adquisición reciente de la infección (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011). La creencia que el hongo coloniza a un individuo en los primeros años de vida y es capaz de causar neumonía solamente cuando el sistema inmune se ve comprometido cada vez tiene más evidencia en contra y la idea de que la PcP se produce por lo general por infecciones *de novo* no relacionadas con el contacto en la infancia va cogiendo cada vez más fuerza (de Boer *et al.*, 2018; C. F. J. Thomas & Limper, 2007).

Se ha planteado que la transmisión de *Pneumocystis* se da por la vía aérea, por medio de aerosoles entre pacientes con PcP o por contacto en la edad temprana con personas portadoras del hongo (Brown *et al.*, 2012). La forma de transmisión es similar a aquella de *Mycobacterium tuberculosis* por el tamaño de las formas tróficas (entre 2 a 4µm para *P. jirovecii* y entre 1-3µm para el bacilo tuberculoso), estas pueden ser expectoradas por la persona infectada y adquiridas por el individuo susceptible por gotitas de Pflugge (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Recientemente Montes-Cano y colaboradores han descrito evidencias moleculares de transmisión vertical transplacentaria de *Pneumocystis jirovecii* en humanos (Montes-Cano *et al.*, 2009), esto se había demostrado anteriormente en conejos pero no se ha visto en ratas o ratones modelos con inmunodeficiencia severa (Friaza Patiño, 2017; Sánchez *et al.*, 2007).

### ***Clínica y tratamiento***

Las manifestaciones de la infección están asociadas al tracto respiratorio y los síntomas son, por lo general, no específicos, estos incluyen fiebre, tos, dolor de tórax, y dificultad al respirar al igual que muchas otras infecciones de carácter pulmonar por lo que la PcP es difícil de diagnosticar solamente por la clínica del paciente, los síntomas son diferentes y menores en pacientes VIH positivos en comparación con aquellos pacientes inmunodeprimidos por otras razones (White *et al.*, 2017).

El examen clínico del paciente puede estar acompañado de taquipnea, taquicardia y cianosis (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011). La radiografía de tórax por lo general es normal durante las primeras etapas de la enfermedad, pero empeora rápidamente sobretodo en pacientes VIH negativos, la tomografía computarizada, por otro lado, es capaz de identificar evidencias de la infección aun en las etapas tempranas, típicamente en esta se pueden observar infiltrados intersticiales difusos (White *et al.*, 2017).

La PcP puede ser mortal, sobre todo en pacientes VIH negativos, por lo que un tratamiento temprano mejora la prognosis. En la clínica el tratamiento con antimicrobianos debe iniciarse el momento de la sospecha, incluso antes del diagnóstico, de la misma manera, la profilaxis está recomendada en

pacientes de alto riesgo (White *et al.*, 2017). El tratamiento dependerá del paciente, siendo diferentes los tratamientos necesarios para pacientes VIH positivos y negativos y dependiendo del tipo de inmunosupresión que el paciente presente, la tabla 4 describe el tratamiento recomendado para diferentes tipos de pacientes de riesgo de PcP (White *et al.*, 2017). Las dosis fijas de trimetoprim y sulfametoxazol es el tratamiento de elección para el tratamiento y la profilaxis por su eficacia y disponibilidad (oral o intravenosa), por desgracia los efectos adversos y alergias son comunes por lo que en estos casos el tratamiento se debe cambiar a prednisona (C. F. Thomas & Limper, 2004).

Tabla 4. Tratamiento recomendado para adultos diagnosticados con PcP (White *et al.*, 2017).

Recommendation	Guidelines (population)		
	CDC, NIH, HIVMA/IDSA (HIV) [12]	ECIL (hematology) [18]	American Society of Transplantation (SOT) [14]
Targeted Treatment	Population HIV/AIDS patients with suspected/ diagnosed PcP	Hematological malignancy, solid cancer, solid organ transplant, autoimmune/inflammatory conditions with suspected/diagnosed PcP	All SOT with suspected/ diagnosed PcP
	Duration 3 weeks	A minimum of 14 days	At least 14 days, extended to 21 days for severe cases
	Therapy <sup>a</sup> Frontline: Trimethoprim/ sulfamethoxazole (15–20 mg/kg TMP; 75–100 mg/kg SMX per day) For moderate-to-severe disease (i.e. hypoxemia) adjunctive corticosteroids should be used Second line for severe disease: Primaquine and clindamycin (30 mg/ (600mgx3)) per day Pentamidine IV (4 mg/kg/day) Second line for mild/moderate disease: Dapsone (100 mg daily) + trimethoprim (15 mg daily) Atovaquone (750 mg BID)	Frontline: Trimethoprim/sulfamethoxazole (15–20 mg/ kg TMP; 75–100 mg/kg SMX per day) Second line: Primaquine and clindamycin (30 mg/(600mgx3)) per day Pentamidine IV (4 mg/kg/day)	Frontline: Trimethoprim/ sulfamethoxazole (15–20 mg/kg TMP; 75–100 mg/kg SMX per day) with TMP administered by IV every 6–8 h. For hypoxemic patients potentially in combination with 40–60 mg of prednisolone (twice daily) Second line: IV Pentamidine (Initially 4 mg/kg/day over 1–2 h) Recipients of pancreas/ islet transplants should receive an alternative second-line therapy.

<sup>a</sup>Where possible, only the recommendation receiving an 'A' grading or the preferred drug of choice have been listed.

## Diagnóstico

*Pneumocystis jirovecii* es un hongo no cultivable, el diagnóstico se basa en la visualización de los quistes y trofozoítos del organismo mediante tinción Giemsa o Gomori-Grocott, en muestras de lavado broncoalveolar, esputo o tejido pulmonar de biopsia, actualmente se están realizando pruebas con muestras de lavados orofaríngeos, exudados nasales o aspirados nasofaríngeos para evitar técnicas invasivas, la sensibilidad de esta es menor al 67% en pacientes VIH negativos (Lawrence, Sadarangani, & Jacobson, 2017), la tinción además tiene una sensibilidad aún menor en muestras de aspirados nasales o de esputo, variando entre el 35 y 78% (Flori *et al.*, 2004), por esto y por el elevado costo del uso de anticuerpos monoclonales para inmunofluorescencia directa se ha puesto en evidencia la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico moleculares para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* en la clínica (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Se han evaluado técnicas moleculares de diagnóstico utilizando tanto PCR anidada y PCR a tiempo real, las cuales han mostrado una gran sensibilidad, en el caso de la PCR a tiempo real esta tiene la ventaja de la posibilidad de determinar, mediante cuantificación entre una colonización y una infección activa (Flori *et al.*, 2004). Se han utilizado varios genes diferentes para la detección del hongo (Tabla 5), varios autores coinciden que el gen de la subunidad larga ribosomal de la mitocondria (mtLSU rRNA) es el mejor candidato para la detección de *Pneumocystis* por lo que actualmente este es el gen mayormente utilizado para el diagnóstico mediante PCR anidada, la que ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad para



la detección del organismo. Esta PCR anidada, sin embargo, tiene muchos resultados falsos positivos, es susceptible a contaminación y necesita entre 6 y 8 horas (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Tabla 5. Estudios de genes evaluados en *Pneumocystis jirovecii* (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Diana/Tipo de RCP	Abreviatura para identificar los cebadores	Secuencias de cebadores	Referencia	
Arom (5-enolpiruvilsiquimato 3- fosfato sintasa RCP anidada)	Primera ronda AroFunivB	5' ATCCCACCAN(T,C)(A,C)NGGCCA 3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3	
	AroFunivC	5'(A,G)ATATGGA(A,G)(T,C)CAATGACNGA 3'		
	Segunda ronda HsPcaro1/RI HsPcaro2/RI	5'GGGAATTCTTAACAACAACAATTTTAGCC 3' 5'GGGAATTCCGGTAAAATGCATGCCAAGAC 3'		Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3
β-tubulina RCP simple	Cebador 1	5' TCATTAGGTGGTGAACGGG 3'	Ma L. J Infect Dis. 2002;186 (11):1647-54	
	Cebador 2	5' ATCACCATATCCTGGATCCG 3'		
cdc 2 RCP tiempo real	Cebador 1	5' AGGTAGGAGAAGGTAAGAAA 3'	Arcenas RC. Diag Microbiol Infect Dis. 2006;54(3):169-75	
	Cebador 2	5'GCTGTGCTTGGAAACC-3		
	Sondas de hibridación	5'GAT CTT GAA AAT GGC ACA ATA GTA G- fluorescein-3'		
		5'Red 640-TTA AAA AAA TCC GGC TAG AAG CAG AAG-phosphate-3'		
Citocromo B RCP simple	CytbFw	5'CCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATT 3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010;10(2):192-9	
	CytbRw	5'AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA 3'		
DHPS RCP anidada	Primera ronda DHPS F1 DHPS B <sub>45</sub>	5' CCTGGTATTAACCAGTTTGGCC 3' 5'CAATTTAATAAATTTCTTTCCAAATAGCATC 3'	Lane BR. J Infect Dis. 1997; 175(2):482-5	
	Segunda ronda DHPS A <sub>Hum</sub> DHPS BN	5'GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC 3' 5'GGAACTTTCAACTTGGCAACCAC 3'		Lane BR. J Infect Dis. 1997; 175(2):482-5
	DHFR RCP anidada	Primera ronda FR 208 FR 1038	5'GAC GAA AGT AGG TAC ATT ATT ACG AGA 3' 5'AAC CAG TTA CCT AAT CAA ACT ATA TTG C 3'	Ma L. J Infect Dis. 1999;180(6): 1969-78
		Segunda ronda FR 242 FR 1018	5' GTTTGAATAGATTATGT TCA TGG TGT ACG 3' 5'GCTTCAAACCTTGTGTAACGCG3'	

Diana/Tipo de RCP	Abreviatura para identificar los cebadores	Secuencias de cebadores	Referencia
ITS RCP anidada	Primera ronda 1724F	5' AAGTTGATCAAATTTGGTC3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995; 33(10):2785-8
	ITS2R	5' CTCGGACGAGGATCCTCGCC 3'	
	Segunda ronda ITS1F	5' CGTAGGTGAACCTGCGGAAAGGATC 3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995; 33(10):2785-8
	ITS2R1	5' GTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG 3'	
Hsp 70 RCP en transcripción reversa	HSP-Ph-SA2	5' GTATTAGGAAAAGATGAAA G 3'	Latouche S. J Eukaryot Microbiol 2001;Suppl:176S-177S
	HSP-Ph-SA1	5' CAGTAGGCTCATTGATTAA 3'	
MSG RCP simple	GK242	5' TATTTCTGTATCTATGCGCT 3'	Ma L. J Infect Dis. 2002;186 (11):1647-54
	GK244	5' TCCGCGCAAAAATAAGCACT 3'	
mt LSU rRNA RCP anidada	Primera ronda pAZ102-H	5' GTGTACGTTGCAAAGTACTC 3'	Wakefield AE. Lancet. 1990; 336(8713):451-3
	pAZ102-E	5' GATGGCTGTTTCCAAGCCCA 3'	
	Segunda ronda pAZ102-X	5' GTGAAATACAAATCGGACTAGG 3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3
	pAZ102-Y	5' TCACTTAATATTAATTGGGGAGC 3'	
mt SSU rRNA RCP anidada	Primera ronda pAZ112-10F/RI	5' GGGAATTCTAGACGGTCACAGAGATCAG 3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3
	pAZ112-10R/RI	5' GGGAATTCGAACGATTACTAGCAATTCC 3'	
	Segunda ronda pAZ112-13/RI	5' GGGAATTCGAAGCATGTTGTTAATTTCG 3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3
	pAZ112-14/RI	5' GGGAATTCCTCAAAGAA(T,C)CGAGTT(T,C)CAG3'	
5 S rRNA RCP simple	Cebador 1	5'-AGTTACGGCCATACCTCA-3'	Kidata K. J Protozool. 1991; 38(6):90S-91S
	Cebador 2	5'-AAAGCTACAGCACGTC-3'	
18 S rRNA RCP anidada	Primera ronda 340a	5' CCAGATTAGCTTTTGCTGATCGCGGG3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995; 33(10):2785-8
	708	5' ACTTTCCAGTAATAGGCTTATCG3'	
	Segunda ronda JK1	5' TGTTGGCATGAAGCCAATGGAA3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995; 33(10):2785-8
	JK2	5' CAATAACCCATCACCAGTCCGAAG3'	
26 S rRNA nuclear RCP simple	Cebador 1	5' GAAGAAATTCAACCAAGC 3'	Nahimana A. J Med Microbiol. 2000;49(8):753-8
	Cebador 2	5' ATTTGGCTACCTTAAGAG 3'	
SOD (superóxido dismutasa) RCP simple	MnSODFw	5' GGGTTTAATTAGTCTTTTTAGGCAC 3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010;10(2):192-9'
	MnSODRw	5' AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA 3'	
TS RCP simple	TSFw	5' GTTTC AATGGCGACCTTCG 3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010;10(2):192-9
	TSRw	5' GGAACACCTAGCCCCATG TC3'	
Trr1 (tioredoxin reductasa) RCP simple	Trr1Fw	5' ATGGCAACTGGGGCGTAT 3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010;10(2):192-9
	Trr1Fr	5' CAAGTCCTGCCATACATCCACT 3'	



## Capítulo 1

### 1. Introducción

Como hemos comentado en la introducción general, hay evidencias convincentes que sugieren que la infección por *Pneumocystis jirovecii* puede ser patogénica para ciertos grupos de edad infantil y puede condicionar el desarrollo de respuestas inmunes alteradas en bebés o adultos mayores. Actualmente, el método generalmente aceptado para detectar *Pneumocystis* es la amplificación por PCR anidada de una región del gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad grande mitocondrial de *Pneumocystis*. Sin embargo, la PCR anidada consume mucho tiempo (6h-8h), la apertura de los tubos entre la primera y segunda ronda de PCRs aumenta considerablemente el riesgo de contaminación. Por esta razón, una PCR de ciclo único es preferible que una PCR anidada en laboratorios clínicos y de rutina de investigación.

Las principales glicoproteínas de superficie (MSG) de *Pneumocystis* están codificadas por una superfamilia multicopia exclusiva de genes relacionados pero distintos. Parecen ser el objetivo de la respuesta inmune del huésped por lo que *Pneumocystis* varía la expresión de MSG para evadir los mecanismos de defensa del huésped. Las MSG son las proteínas más expresadas de *Pneumocystis*, encontrando de 64 a 179 genes únicos por especie. Por todo ello, uno de los objetivos principales es la optimización de una real-time PCR cuantitativa, de ciclo único y que permita cuantificar. Esta nueva real-time está basada en las secuencias MSG y detecta el DNA sintetizado con SYBR Green I, que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario.

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Muestras biológicas

Las 54 muestras de pulmón procedentes de autopsias fueron recolectadas de niños fallecidos, en su mayoría, por el Síndrome de Muerte Súbita del Lactante (SMSL) en Chile entre los años 2001-2004. Éstas correspondían a niños de hasta 12 meses de edad. El DNA fue extraído en Chile a partir de 0,2 g de tejido pulmonar con un kit comercial y enviado a España para su procesamiento posterior. Además, antes del envío se confirmó la presencia o no de *Pneumocystis jirovecii* mediante PCR anidada de la subunidad grande mitocondrial del rRNA (mtLSU rRNA) donde para la primera ronda se utilizaron la pareja de cebadores externos PAZ102E-PAZ102H y para la segunda se utilizaron los cebadores internos PAZ102X y PAZ102Y.

#### 2.2. Confirmación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii*

Cuando las extracciones de DNA llegaron al laboratorio del FISABIO, un grupo de muestras clasificadas como positivas fueron analizadas de nuevo con la PCR anidada de la subunidad grande mitocondrial del rRNA (mtLSU rRNA), para confirmar los resultados obtenidos previamente en Chile. Para ello, la primera ronda de PCR con la pareja de cebadores externos PAZ102E-PAZ102H se realizó en un volumen final de 25µl de una mezcla que contenía: 12,5µl de GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), 1µl de cada cebador (10µM), 5,5µl de agua ultra pura y 5µl del extracto de ADN, además se incluyó un control negativo añadiendo agua en lugar de DNA. Para la segunda se utilizaron los cebadores internos PAZ102X y PAZ102Y y las mismas condiciones que la primera, con la excepción del DNA molde que en este caso fueron 5µl de la primera PCR. El programa térmico de ambas rondas de PCR incluyó una etapa de preincubación inicial de 10 minutos a 95°C, una etapa de amplificación de 45 ciclos en el que cada ciclo consistía en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 80 seg a 72°C por último se incluyó

una etapa final de 10 minutos a 72°C. La síntesis de productos de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante la separación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 0.8%.

### **2.3. Confirmación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii* con la detección de las principales glicoproteínas de superficie (MSG) mediante PCR a tiempo real.**

En un trabajo previo en el grupo de investigación del área de Genómica y Salud del Dr. Andrés Moya (FISABIO) se diseñaron con el programa Primer Express varias parejas de cebadores que anillan en secuencias conservadas de la región 3' de las MSG tipo A, determinando posteriormente que la pareja PNEU3F y PNEU2R permite obtener una detección más sensible. Con esta pareja de cebadores se confirmó la presencia de *Pneumocystis jirovecii* mediante PCR a tiempo real en la plataforma LightCycler® 480 Instrument II (Roche) utilizando placas multipocillo de 96 pocillos en un volumen final de 10µl con un mix de reacción que contenía: 5µl de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,3µl de cada cebador (10µM), 2,4µl de agua ultra pura y 2µl del extracto de DNA directamente, o de una alícuota con una concentración ~10ng/µl. Además, en cada ronda de PCR se incluyeron controles negativos como DNA de paciente no infectado con *Pneumocystis* o agua en lugar de DNA. Dos réplicas por muestra se incluyeron en cada real-time PCR. También se evaluó la especificidad de la pareja de cebadores nuevos PNEU3F-PNEU2R con otros patógenos pulmonares tales como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

El programa térmico incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5min, una etapa de amplificación de 45 ciclos en el que cada ciclo consistía en 2 o 10 segundos a 95°C, 5 o 10 segundos a 60, o 58 y 15 segundos a 72°C. El análisis de melting consistió en un minuto a 95°C, 1 minuto a 40°C y un segundo a 70°C, por último, se incluyó un paso de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. La síntesis de productos de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler y mediante la separación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2%.

### **2.4. Desarrollo de un método general para cuantificar el número de copias de MSG tipo A en biopsias de pulmón.**

Para la determinación del número absoluto de copias de MSG tipo A en biopsias de pulmón, se sintetizaron *in vitro* amplicones del DNA diana de la región seleccionada a partir de un extracto de un aspirado nasal de un paciente de Mozambique con diagnóstico clínico positivo para PCP y VIH. Se utilizaron diluciones seriadas de estos en ensayos de PCR a tiempo real para generar la curva estándar. El producto de la amplificación se purificó utilizando el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del purificado se determinó utilizando Qubit™ 3.0 Fluorometer (Invitrogen) y posteriormente se prepararon diluciones seriadas (1/10) tanto en extracto de ADN de un paciente no infectado con *Pneumocystis* como en agua ultra pura, las diluciones tenían de 10<sup>8</sup> a 10<sup>0</sup> copias del fragmento amplificado. El número de copias del amplicón en cada dilución se calculó con la fórmula

$$\frac{ng_{amplicón} * número de abogadro}{tamaño del amplicón * 1 * 10^9 * 660 \text{ daltons}}$$
. Se realizaron en paralelo diluciones seriadas del mismo amplicón en agua. Se construyeron curvas estándar tanto en agua como en extracto de pulmón representando los valores del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración del fragmento de interés. La eficiencia de la amplificación se calculó a partir de la pendiente de la correspondiente curva utilizando la fórmula  $10^{(-1/pendiente \text{ de la curva estándar})}$  o la misma fórmula x 100 cuando se representa el valor como un porcentaje.

Una vez obtenida la curva estándar esta se utilizó para determinar el número de copias de MSG tipo A de *Pneumocystis* en las muestras de autopsia de pulmón.

### 3. Resultados

#### 3.1. Confirmación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii*

El método que se utilizó en un primer momento para la determinación de *Pneumocystis jirovecii* fue la PCR anidada de la subunidad grande del RNA ribosomal mitocondrial (mtLSU rRNA). Este método confirmó la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en un total de 36 muestras de las 54 extraídas de autopsias de pulmón de infantes. Las muestras o pacientes que resultaron negativos se clasificaron como muestras de la 1 a la 18, mientras que las que resultaron positivas de la muestra 19 a la 54, siendo algunas de éstas positivas en la primera ronda y otras solamente en la segunda ronda de PCR. Una vez en España, algunas de las muestras clasificadas como positivas (muestras 32, 33, 34, 53 y 54) fueron confirmadas de nuevo mediante la PCR anidada (Figura 1).

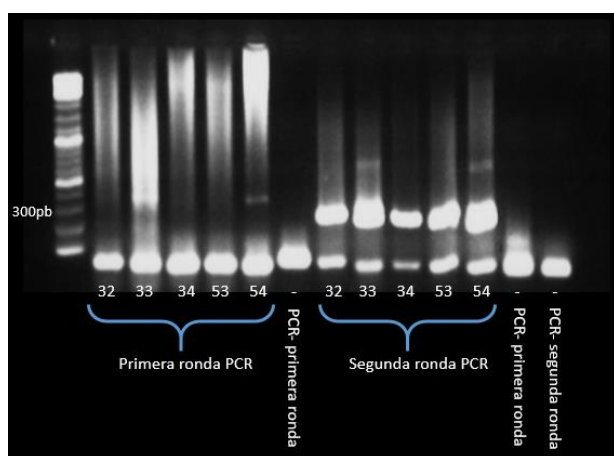


Figura 1. Primera y segunda ronda de PCR anidada para mtLSU rRNA para la confirmación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en 5 muestras de biopsia de pulmón (muestras 32, 33, 34, 53 y 54) utilizando los cebadores PAZ102E y PAZ102H en la primera ronda y PAZ102X y PAZ102Y en la segunda ronda.

Los niños incluidos en este estudio fallecieron en su mayoría, por SMS del lactante. A continuación, mostramos una tabla con los datos clínicos y diagnóstico final de los pacientes incluidos en el estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Datos clínicos y diagnóstico final de los pacientes incluidos en el estudio. En amarillo los pacientes que resultaron inicialmente negativos y en naranja los pacientes con valores superiores a Ct 36. En ambos grupos el porcentaje de lecturas de *Pneumocystis* es igual o inferior al 1%.

N° MUESTRA	N° Protocolo Autopsia	Año	Sexo	Edad a la fecha de fallecimiento	Peso	Talla	Lóbulo	Circunstancia de Muerte	Subclasificación	Diagnóstico Final
1	1650	2001	F	1,20	4,80	54	LSD	MS MAS P	MALFORMACION CONGENITA	
2	1688	2001	M	1,40			LSD	NMS	BRONCONEUMONIA	BRN, Intoxicación por Drogas?
3	2223	2001	M	1,53			LSD	MS MAS P	INFLAMACION PULM	Patología Pulmonar
4	2474	2001	F	2,80	5,50	60	LSD	SMS		SMS
5	3050	2001	F	1,40	4,80	55	LSD	SMS		SMS
6	172	2002	F	1,08			LSM	NMS	TRAUMATISMO	Muerte Traumática
7	153	2002	M	1,10	2,18	48	LSD	SMS		SMS
8	1783	2002	M	8,90	8,80	63	LSD	SMS		SMS
9	1832	2002	F	5,30	10,2	69	LSD	MS MAS P	MALFORMACION CONG	Hallazgos Patológicos Cerebrales Múltiples
10	1651	2002	F	1,13			LSD	SMS		SMS
11	3384	2002	F	1,13	3,70	54	LSD	SMS		SMS
12	9	2003	F	1,53	4,37	51	LSD	SMS		SMS
13	10	2003	F	1,80	4,58	56	LSD	SMS		SMS Infantil

14	284	2003	M	9,20	8,90	68	LSD	SMS		SMS
15	865	2003	M	2,20	4,8	53	LSD	NMS	MALFORMACION CONG	CC severa operado
16	1225	2003	M	3,10	5,60	61	LSI	SMS		SMS
17	1231	2003	F	11,90	9,90	68	LSD	NMS	OTROS	Esteato Hepatitis con necrosis en puentes y signos morfológicos de shock Hepatopatía, Hepatitis viral fulminante
18	326	2004	M	2,00			LSD	SMS		Síndrome de muerte Súbita del Lactante
19	59	2001	M	2,70			LSD	SMS		SMS
20	486	2001	F	1,60			LSM	SMS		SMS
21	1127	2001	F	3,10	6,40	58	LSD	SMS		SMS
22	1244	2001	M	9,10			LSD	SMS		SMS
23	2448	2001	M	3,10			LSD	SMS		SMS
24	2475	2001	F	1,00			LSI	SMS		SMS
25	2488	2001	F	3,26			LSD	SMS		SMS
26	2604	2001	F	3,30			LSD	SMS		SMS
27	2694	2001	F	1,53			LSD	SMS		SMS
28	2737	2001	M	3,20	5,90	58	LSD	SMS		SMS
29	2992	2001	F	2,23			LSD	SMS		SMS
30	3002	2001	F	5,16			LSD	SMS		SMS
31	3356	2001	M	2,47	4,1	55	LSD	SMS		SMS
32	3550	2001	F	3,33			LSM	SMS		SMS
33	333	2002	M	2,33	5,70	60	LSD	SMS		SMS infantil
34	1082	2002	F	2,33	3,40	47	LSD	SMS		SMS
35	1309	2002	M	5,33	8,40	64	LSM	SMS		SMS
36	1485	2002	M	6,10	6,34	62	LSI	MS MAS P	SIGNOS DE INFEC	Muerte en domicilio, Varicela, Bronquitis, Miocarditis
37	1650	2002	F	1,66			LSD	MS MAS P	INFLAMACION PULM	SMS con Focos de Enfisema Alveolar Irregular
38	1708	2002	M	2,30			LSM	MS MAS P	INFLAMACION PULM	Autopsia Incompleta
39	1784	2002	M	3,33	5,70	59	LSM	SMS		Muerte Súbita Infantil
40	1794	2002	F	2,80	4,90	60	LSD	SMS		SMS
41	2455	2002	M	1,83	4,60	57	LSM	SMS		Síndrome de Muerte Súbita en el Lactante
42	2790	2002	M	3,27	6,40	63	LSI	MS MAS P	SIGNOS DE INFEC	Síndrome de Muerte Súbita del lactante Hepatitis granulomatosa de causa no especificada
43	2933	2002	F	2,20	3,50	53	LSM	SMS		Síndrome de Muerte Súbita del Lactante
44	3735	2002	F	3,50	6,60	66	LSI	SMS		Síndrome de Muerte Súbita del Lactante
45	738	2003	M	4,80	7,1	63	LSI	MS MAS P	INFLAMACION PULM	Neumonitis



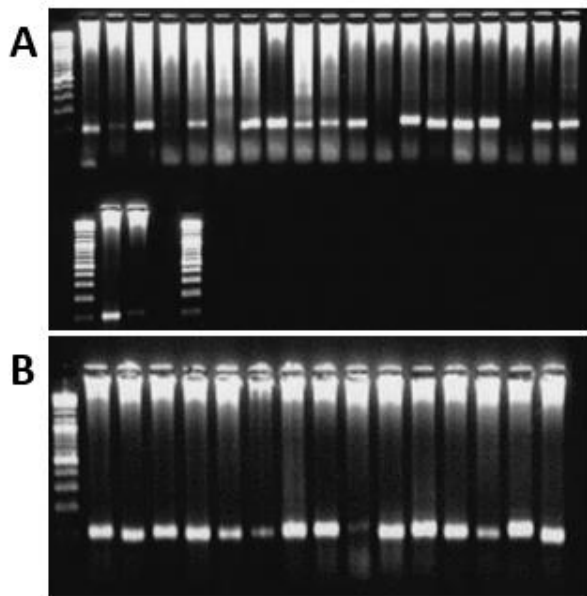


Figura 3. A) Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras 19- 39 mediante real-time PCR MSG. B) Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras 40-54 mediante real-time PCR MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R

Debido al resultado negativo obtenido para las muestras 22, 24, 30 y 35, éstas se evaluaron de nuevo mediante la PCR anidada (Figura 4), obteniendo un resultado positivo en la segunda ronda de PCR, con los oligos internos. Además, se incluyó la muestra 39 que había mostrado un positivo débil, resultando negativa también en la primera ronda de PCR y sólo positiva en la segunda ronda. Confirmando así que se trata de muestras positivas para *Pneumocystis jirovecii*.

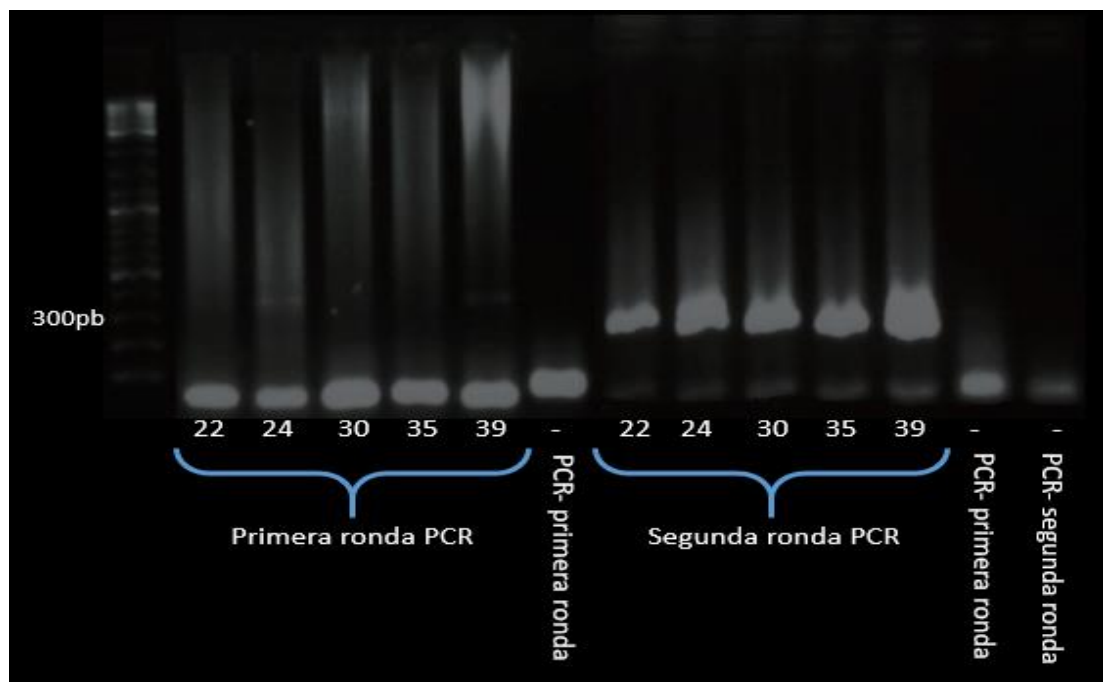


Figura 4. Primera y segunda ronda de PCR anidada para mtLSU rRNA para la confirmación de la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en 5 muestras de biopsia de pulmón (muestras 22, 24, 30, 35 y 39) utilizando los cebadores PAZ102E y PAZ102H en la primera ronda y PAZ102X y PAZ102Y en la segunda ronda.

Ya que un resultado negativo podría ser debido a un problema de anillado de los oligos por la presencia de múltiples posiciones variables en esa región en estos pacientes, resultando menos eficientes, se

evaluó la amplificación de estas 4 muestras (22, 24, 30 y 35) con una temperatura en la etapa de anillado de 58°C, obteniendo en esta ocasión un resultado positivo para las 4 muestras (Figura 5).

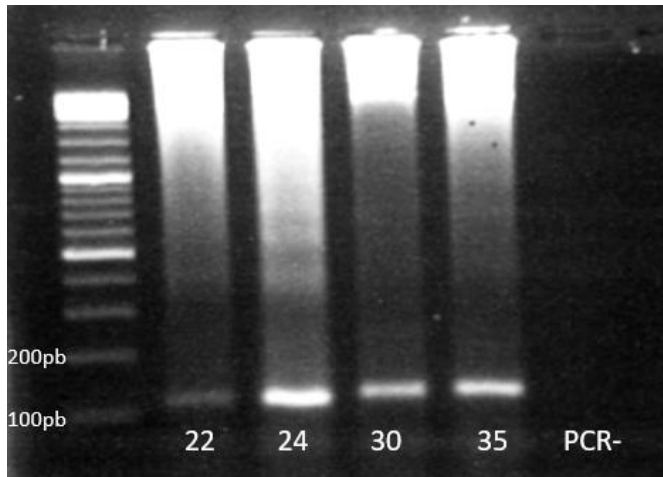


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras 22, 24, 30 y 35 mediante real-time PCR MSG con una temperatura de anillamiento de 58°C, utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

Otro problema que se detectó al utilizar el DNA directamente de la extracción, superando así la cantidad recomendada por la casa comercial Roche de 5-30ng de DNA por reacción, es que no se observó en la mayoría de muestras una curva típica de amplificación, dificultando el análisis del valor del ciclo umbral de las muestras (Ct). Además, la electroforesis en gel de agarosa mostró en este caso una mala definición de las bandas del producto de interés y un *smear* por exceso de ADN (Figura 6).

Por ello, todas las extracciones de DNA se diluyeron a concentraciones alrededor de los 10ng/μl y se evaluaron de nuevo mediante real-time PCR MSG mostrando curvas de amplificación típicas facilitando su análisis, la electroforesis realizada mostró además bandas bien definidas del producto de interés. El exceso de DNA en algunos casos pudo inhibir la reacción.

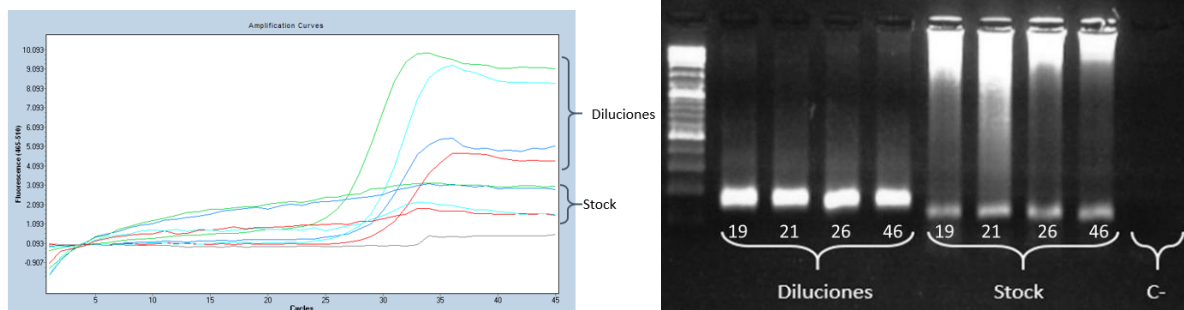


Figura 6. Comparación de las curvas de amplificación y electroforesis en gel de agarosa al 2% de una real-time PCR MSG A entre diluciones (~10ng/μl) y stocks de las muestras 19, 21, 26 y 46, utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

También se evaluaron de nuevo las muestras procedentes de los pacientes 22, 24, 30 y 35 con las diluciones de 10ng/μl y anillando los oligos a 60°C, observando también en este caso un resultado positivo (Figura 7).



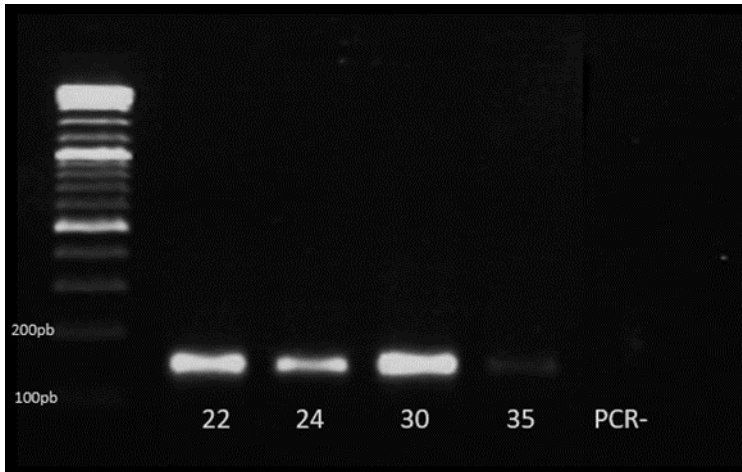


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación de las diluciones de las muestras 22, 24, 30 y 35 mediante real-time PCR MSG con una temperatura de anillamiento de 60°C, utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

Además, se evaluó la especificidad del par de cebadores nuevos PNEU3F-PNEU2R (MSG *Pneumocystis*) con otros patógenos pulmonares tales como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* ya que en el laboratorio se disponía de extractos de DNA de estos hongos. En ningún caso se observó amplificación con ninguno de ellos y el perfil de sus curvas de fusión, no difirió del obtenido a partir del control negativo de PCR (Figura 8).

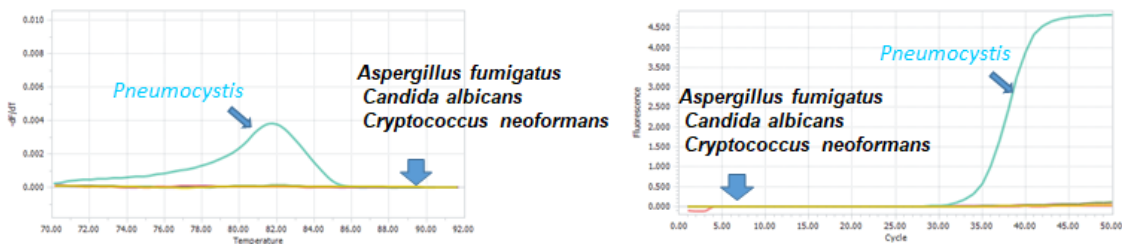


Figura 8. Curvas de fusión y amplificación de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* en relación a *Pneumocystis jirovecii* utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

### 3.2 Cuantificación de copias de MSG tipo A

Para calcular el número de copias de MSG A se prepararon y evaluaron dos curvas estándar utilizando diluciones seriadas (1/10) de amplicones de DNA de MSG tipo A de *Pneumocystis* en extracto de pulmón o en agua ultra pura que cubrían el intervalo de  $10^8$  a  $10^0$  copias (Figura 9). Ambas mostraron una fuerte correlación lineal con coeficientes de correlación de 0,9992 y 0,9998, respectivamente, y eficiencias de amplificación de 95,6 y 94,6% respectivamente. El protocolo de PCR a tiempo real permitió la detección consistente de hasta una copia de MSG tipo A de *Pneumocystis* y la cuantificación de al menos 100 copias.



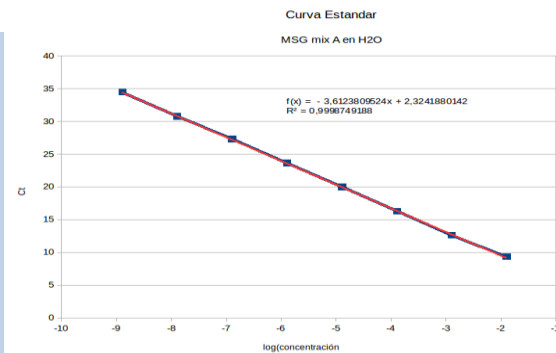
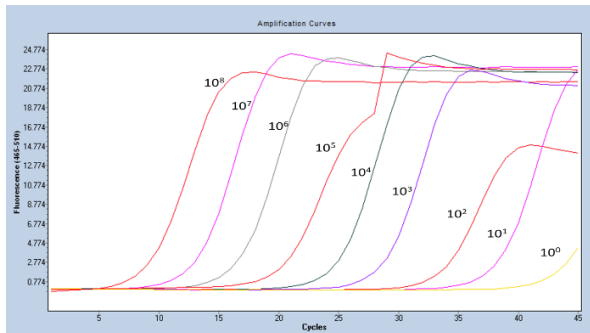
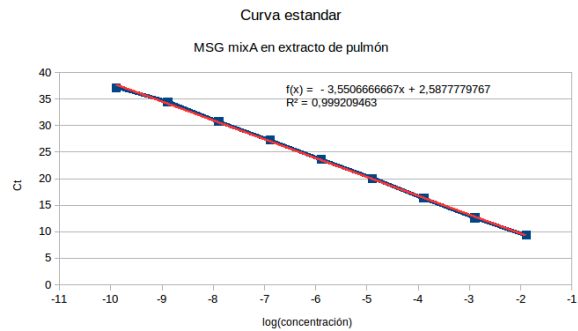
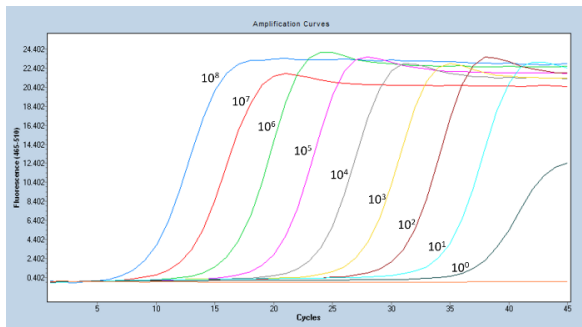


Figura 9. Curvas de amplificación de PCR a tiempo real utilizando diluciones seriadas (1/10) de amplicones de ADN de MSG tipo A de *Pneumocystis* en extracto de pulmón (A) y agua ultra pura (B) amplificados con PNEU3F y PNEU2R. Cada dilución corresponde a un número de copias de DNA diana que oscila de 10<sup>8</sup> a 10<sup>0</sup> copias. El eje de las abscisas indica el número del ciclo de PCR muestras que el eje de las ordenadas indica la intensidad de la fluorescencia. Se obtuvieron curvas estándar mediante regresión lineal representando los valores del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración inicial de DNA diana.

En ambas curvas estándar se obtuvieron valores Ct similares, se determinó que la curva estándar obtenida en extracto de pulmón se asemejaba más a las condiciones reales de las muestras a analizar. Por lo tanto, una vez optimizadas las condiciones de la curva estándar en extracto de pulmón se calculó el valor Ct para cada una de las muestras y se cuantificaron. Los valores medios de Ct obtenidos oscilaron de 26.82±0.08 a 40.00±0.00 y el número estimado de copias de MSG tipo A fue de 1.1 x 10<sup>3</sup> a menos de una copia (Tabla 2). Todos los productos de amplificación mostraron un único pico en la curva de disociación, con valores de T<sub>m</sub> entre 81-83°C (Figura 10). También los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en todos los casos se observó una banda única del tamaño esperado (117pb).

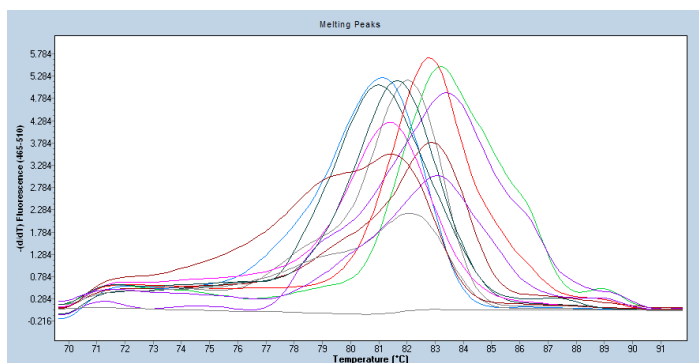


Figura 10. Curvas de fusión de las muestras positivas 34 a la 45 con valores de T<sub>m</sub> entre 81-83°C, utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R

Tabla 2. Detección y cuantificación absoluta de copias de DNA de MSG tipo A en muestras de autopsias de infantes con muerte súbita relacionada a complicaciones pulmonares mediante PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.

Muestra	Media Ct	Número de copias
19	28,33±0,16	394.77
20	37,19±0,11	1.3
21	26,82±0,08	1102.03
22	37,19±0,27	1.17
23	34,92±0,16	5.5
24	36,85±0,33	1.41
25	30,48±0,03	106.45
26	29,62±0,08	180.66
27	32,24±0,11	32.42
28	34,32±0,15	8.18
29	35,76±0,32	2.88
30	37,88±0,13	0.82
31	33,35±0,11	15.66
32	29,98±0,13	138.07
33	33,65±0,31	11.34
34	30,08±0,18	124.74
35	38,56±0,49	0.42
36	33,50±0,78	9.23
37	34,24±0,66	6.15
38	32,14±0,11	34.33
39	38,82±1,04	0.25
40	36,64±0,09	1.89
41	32,77±0,01	24.33
42	32,77±0,08	23.23
43	28,83±0,12	293.39
44	35,39±0,10	4.21
45	37,49±0,34	0.92
46	31,18±0,76	42.29
47	34,77±0,94	3.66
48	39,61±0,55	0.2
49	35,62±1,39	1.57
50	33,40±2,06	4.28
51	34,40±0,57	5.91
52	40,0±0,00	0.23
53	36,31±0,20	2.17
54	34,22±0,30	7.89

#### 4. Discusión

Durante años el *gold standard* para el diagnóstico de la PcP ha sido la visualización microscópica de quistes y trofozoitos de *Pneumocystis*, sea por diferentes métodos de tinción tradicionales como Giemsa o Gomori-Grocot (Carmona & Limper, 2011; Lawrence, Sadarangani, & Jacobson, 2017), o mediante tinción inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales contra las diferentes formas morfológicas del organismo (Alanio *et al.*, 2016). La presencia de *Pneumocystis jirovecii* fue detectada sin la necesidad de tinción histoquímica por primera vez en 1990 cuando la aplicación de métodos de PCR fueron utilizados (Peterson & Cushion, 2005; Wakefield *et al.*, 1990). Desde entonces ha habido un aumento en el diseño de métodos de diagnóstico mediante PCR para la detección de neumocistosis para solventar el problema de la baja sensibilidad de las técnicas clásicas utilizadas, varios protocolos

han sido propuestos utilizando diferentes genes diana para su identificación, siendo el más común de estos métodos el uso de PCR anidada para el gen de la subunidad grande mitocondrial del rRNA (Maillet *et al.*, 2014; Morris & Norris, 2012) Ninguno de estos procedimientos permite una cuantificación aproximada de la acumulación del hongo. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real que estima de forma fiable el número de copias de MSG tipo A de *Pneumocystis jirovecii* en biopsias de pulmón de individuos infectados.

El principal problema al estandarizar el protocolo de detección fue la alta variabilidad de los fragmentos de interés. Las proteínas Msg tipo A de *Pneumocystis jirovecii* están codificadas por una superfamilia multicopia exclusiva de genes que corresponden a entre el 3 y el 6% del genoma total del organismo (Ma, Cissé, & Kovacs, 2018) además la variabilidad entre las proteínas MSG ha sido documentada anteriormente (Emanuel Schmid-Siegert *et al.*, 2017; Keely & Stringer, 2009; Ma *et al.*, 2018; Rudramurthy *et al.*, 2017; Thomas & Limper, 2007). Cuatro de las muestras (22, 24, 30 y 35) fueron negativas con el protocolo de real-time PCR MSG pero positivas para mtLSU rRNA por lo que se supuso un problema de variabilidad en la región amplificada, al bajar la temperatura de anillamiento a 58°C y la concentración del molde de DNA utilizado para la amplificación a ~10ng/μl se logró el anillamiento de los oligos con estas muestras variables y la identificación de MSG tipo A en un 100% de las muestras de biopsia de pulmón positivas para *Pneumocystis jirovecii*. En todos los casos el tamaño de los amplicones obtenidos mediante el protocolo de PCR a tiempo real para MSG fue el mismo (117pb), lo que se confirmó mediante la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. La ausencia de amplificación utilizando preparaciones de DNA de individuos sanos y de otros patógenos pulmonares confirmó que el protocolo y los oligos utilizados eran específicos para MSG tipo A de *Pneumocystis*. La fluctuación en las temperaturas de fusión entre los 81-83°C refuerza aún más la idea de la alta variabilidad en los genes MSG A y la existencia de muchos genotipos que pueden infectar a la vez a un mismo individuo.

El proceso, a diferencia de la PCR anidada mtLSU rRNA comúnmente utilizada, se realiza en un solo tubo, permitiendo un procesamiento rápido y un fácil manejo de la muestra minimizando el riesgo de contaminación (Alanio *et al.*, 2016). El uso de SYBR Green I Master presenta, en este caso una ventaja importante con respecto al uso de sondas específicas de secuencia, la detección de la fluorescencia no se ve afectada por la heterogeneidad de las secuencias presentes en la región delimitada por los cebadores (Navarro, Serrano-Heras, Castaño, & Solera, 2015).

Para eliminar las diferencias en la amplificación de los amplicones generados y las muestras se utilizó extracto de pulmón de pacientes sanos para preparar las diluciones de los amplicones para la curva estándar, teniendo en cuenta el posible efecto de los inhibidores presentes en los extractos, además se extendió la curva estándar a lo largo de un amplio intervalo dinámico (8 unidades logarítmicas de concentración de DNA diana). La fuerte correlación lineal de las curvas estándar, la buena eficiencia de amplificación observada, la reproducibilidad de los valores Ct y el hecho de que la mayoría de los valores Ct de las muestras problema estuvieran dentro del intervalo dinámico de la curva estándar, apoyan la validez del protocolo de PCR a tiempo real para el cálculo del número de copias de DNA de MSG tipo A de *Pneumocystis jirovecii* en biopsias de pulmón.

## Capítulo 2

### 1. Introducción

Un código de barras genético es un fragmento corto de DNA usado para la determinación de especies. Los espacios intergénicos internos (ITS por sus siglas en inglés) han sido propuestos como códigos de barras para especies eucariotas como los hongos (Wang *et al.*, 2014). La zona ITS contiene tres regiones ITS1, 5.8S e ITS2, entre estas la región 5.8S está muy bien conservada entre especies y no contiene suficientes zonas informativas por lo que generalmente no es utilizada para análisis taxonómicos, la zona ITS2 es ampliamente utilizada para el análisis de filogenético de todo tipo de organismos eucariotas. La región ITS1 por otro lado es utilizada en casos específicos para hongos y algunos grupos de plantas (Wang *et al.*, 2014).

En este capítulo se utilizó la secuenciación de la zona ITS1 para la determinación taxonómica de especies presentes en muestras de autopsias de pulmón con el objetivo de la determinar la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en las mismas.

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Determinación de la composición fúngica: Amplicones ITS

A partir del DNA total extraído de las 54 biopsias del tejido pulmonar se llevó a cabo una amplificación y secuenciación de la región ITS1, comprendida entre los genes ribosomales 18S y 5.8S, obteniendo un único amplicón de aproximadamente 305 pares de bases. Los cebadores ITS1-F e ITS2\_KYO1 también incluyen la secuencia de los adaptadores complementarios a los Index de Illumina (en negrita) y al cebador de secuenciación (Figura 1).



Figura 1. Representación esquemática de los genes ribosomales nucleares.

Para preparar la librería, en un primer paso se lleva a cabo mediante PCR la generación del amplicón de interés correspondiente a la región ITS1. A continuación, y tras un paso de purificación de productos de PCR con AMPure Beads, se unen los Index o “barcode” de Illumina mediante una PCR de 8 ciclos. La adición de estos Index permitirá multiplexar hasta 384 muestras dentro de un mismo run. Finalmente se lleva a cabo otro paso de purificación con AMPure Beads. El tamaño final de las librerías generadas será comprobado con Bioanalyzer donde debe observarse un único pico de aproximadamente 350 pb (tamaño de nuestro amplicón más la secuencia del adaptador y los Index). Finalmente, cada una de las librerías deben llevarse a una misma concentración final de 4nM, para poder hacer un único pool equimolar para su posterior secuenciación.

Para la secuenciación con Miseq (Illumina) se utilizó el kit V3 (2x300ciclos), el cual genera, en un run de 65h, lecturas de 300pb comenzando por ambos extremos del amplicón. El hecho de que se realice

la secuenciación por los dos extremos permite un solapamiento de las secuencias durante el procesado de las mismas, obteniendo de esta forma la secuencia completa de nuestro amplicón (350pb). La salida de datos de Miseq es de aproximadamente 40-50 millones de lecturas (15Gb de información).

## 2.2. Análisis informático: Amplicones ITS

En el análisis informático de los amplicones hemos utilizado el programa PRINSEQ para procesar las secuencias y analizar su calidad (eliminación de las de baja calidad y cortas). Posteriormente, hemos unido para cada lectura (R1) su par asociado (R2) con el programa FLASH y a continuación hemos filtrado las secuencias de origen humano con el programa BOWTIE2, (13) que es un sistema para alinear rápidamente grandes conjuntos de cadenas cortas de DNA contra grandes genomas. Por último, hemos realizado la asignación taxonómica de las secuencias fúngicas utilizando la base de datos Ribosomal Database Project Classifier, donde cada lectura es clasificada.

## 2.3. Clonación y secuenciación de muestras con bajo número de lecturas de *Pneumocystis jirovecii*

El producto de amplificación de los individuos 22, 24, 30 y 35 se purificó con el kit High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) siguiendo las recomendaciones del fabricante y cuantificó con el Qubit (Invitrogen) posteriormente ligado al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) siguiendo la relación vector a inserto de 1:3 recomendada, la reacción de ligación fue incubada overnight a 16°C.

El plásmido recombinante obtenido se utilizó posteriormente para transformar alícuotas de 50µl de células *E. coli* NEB 5-alpha (New England BioLab Inc.), por shock térmico. Para ello, 5µl de la reacción de ligación se incubó junto con las células competentes en hielo durante 40 minutos seguido de una incubación de 90 segundos a 42°C. Las bacterias transformadas se incubaron a 37°C durante una hora y posteriormente se sembraron en placas con medio LB Agar + Ampicilina 100µg/ml a las que se le agregó 50µl de IPTG 0,1M y 50µl de XGal 20mg/ml. Las placas fueron incubadas overnight a 37°C.

Las colonias transformadas fueron seleccionadas mediante cribado blanco/azul posible por el gen LacZ del vector utilizado (Figura 2) y aisladas en placas nuevas preparadas con el mismo medio de cultivo. Una vez seleccionadas las colonias blancas se hizo una extracción de plásmidos utilizando el kit Real Miniprep Turbo Kit (Real Life-science solutions). Los plásmidos fueron secuenciados posteriormente por el servicio de secuenciación del IBMCP (Universidad Politécnica de Valencia - CSIC) y el análisis de las secuencias se realizó mediante el programa MegaX.

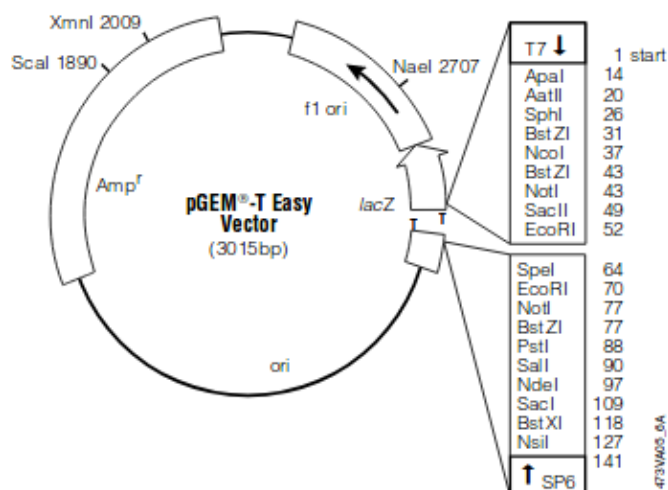


Figura 2. Vector pGEM-T Easy (Promega, 2010)

### 3. Resultados

#### 3.1. Obtención de la librería: amplicones ITS

Cada una de las librerías de cada muestra generada se llevó a una concentración final similar, alrededor de los de 4nM, para poder hacer un único pool equimolar. En algunas muestras ha sido necesario diluir la librería 1/10. Este pool ha sido secuenciado con Miseq Illumina generando millones de secuencias que han sido analizadas. Además, cada muestra lleva una combinación de índices diferente para poder ser identificadas después las secuencias correspondientes (Tabla 1).

Tabla 1. Índices y concentraciones de cada muestra para la secuenciación.

SAMPLE	INDEX N	INDEX S	LIBRERÍAS ng/ $\mu$ l	1:10	SAMPLE	INDEX N	INDEX S	LIBRERÍAS ng/ $\mu$ l	1:10
1	703	504	7		29	707	506	14,3	
2	704	504	3,36		30	708	506		9,37
3	705	504		4,03	31	709	506	10,2	
4	706	504	8,01		32	710	506		4,19
5	707	504	13,4		33	711	506		2,27
6	708	504	3,66		34	712	506		4,1
7	709	504	3,25		35	701	507	5,24	
8	710	504	1,52		36	702	507	5	
9	711	504	2,35		37	703	507		8,74
10	712	504	14,4		38	704	507	12	
11	701	505	4,14		39	705	507		3,95
12	702	505	8,68		40	706	507	13,9	
13	703	505	7,79		41	707	507		2,04
14	704	505	0,802		42	708	507		1,93
15	705	505	4,65		43	709	507		3,21
16	706	505	6,47		44	710	507	3,48	
17	707	505	0,587		45	711	507	1,82	
18	708	505	1,39		46	712	507	19,4	
19	709	505	25,5		47	701	508	9,68	
20	710	505		8,97	48	702	508	5,32	
21	711	505		11,9	49	703	508	4,61	
22	712	505		6,83	50	704	508	9,53	
23	701	506		13	51	705	508	16,9	
24	702	506	8,42		52	706	508	4,01	
25	703	506		13,1	53	707	508	2,33	
26	704	506		4,21	54	708	508	9,83	
27	705	506		7,17	NEG_PCR_1	709	508	1,11	
28	706	506		2,11	NEG_PCR_2	710	508	too low	

#### 3.2. Análisis informático de las lecturas.

El objetivo principal del análisis informático es identificar taxonómicamente nuestras lecturas y calcular la abundancia de cada una de ellas para cada individuo. El software de la máquina Illumina proporciona una carpeta Fastq que contiene los pares de secuencias o lecturas forward (R1) y reverse (R2) para cada individuo. La calidad disminuye hacia el final de la secuencia, por lo que el siguiente paso es filtrar las secuencias por calidad con el programa PRINSEQ (Schmieder, *et al.*, 2011) aplicando los siguientes parámetros:

- min\_length: 50
- trim\_qual\_right: 30
- trim\_qual\_type: mean
- trim\_qual\_window: 20

Básicamente, hemos cortado y retirado las bases con mala calidad (normalmente por debajo de 30 pb) al final de cada secuencia.

Aquí se muestra un ejemplo para el individuo 37, antes y después del control de calidad (Figura 3).

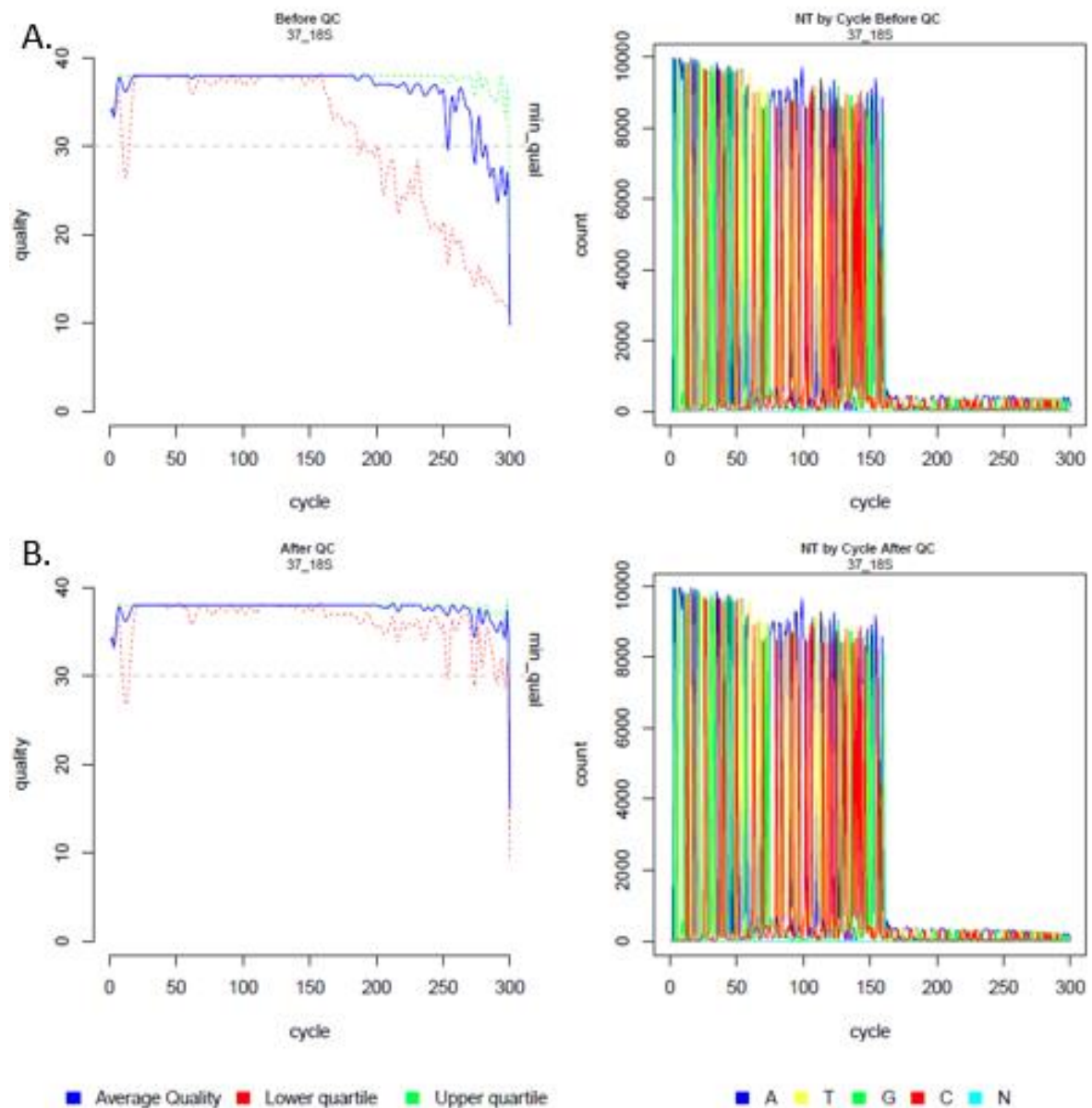


Figura 3. Control de calidad de la secuencia obtenida del individuo 39. A) Calidad antes del control y B) calidad después del control.

Como la mayoría de los pares (R1 y R2) tienen una región superpuesta entre ellos, hemos podido unir ambos con el programa FLASH para obtener secuencias más largas ya que estas son más fiables.

A continuación, el análisis informático con el programa BOWTIE2 donde hemos filtrado las secuencias de origen humano para poder ser eliminadas posteriormente reveló que en 4 de los individuos (11, 14, 52 y 53) el número de lecturas de origen humano superaba valores del 40%, mientras que en 37 individuos este valor no superaba el 10% del total (Tabla2).



Tabla 2. Número de lecturas de origen humano en muestras de biopsia de pulmón. Marcadas en rojo se encuentran las muestras con más del 40% de lecturas correspondientes a humano, aquellas muestras con un porcentaje de lecturas correspondientes a humano menor al 10% están marcadas en azul.

SAMPLE	YES	NO	pctYES	pctNO	SAMPLE	YES	NO	pctYES	pctNO
1-18S	2079	55320	3.62	96.38	29-18S	9496	85242	10.02	89.98
2-18S	2216	39897	5.26	94.74	30-18S	1756	137355	1.26	98.74
3-18S	632	78349	0.8	99.2	31-18S	3368	26450	11.3	88.7
4-18S	754	46151	1.61	98.39	32-18S	3826	85022	4.31	95.69
5-18S	2446	86644	2.75	97.25	33-18S	17420	74819	18.89	81.11
6-18S	2805	43881	6.01	93.99	34-18S	5152	122363	4.04	95.96
7-18S	22127	62005	26.3	73.7	35-18S	6986	97371	6.69	93.31
8-18S	818	94767	0.86	99.14	36-18S	2060	60164	3.31	96.69
9-18S	2348	51125	4.39	95.61	37-18S	9894	460045	2.11	97.89
10-18S	2257	98449	2.24	97.76	38-18S	1007	56908	1.74	98.26
11-18S	49467	62746	44.08	55.92	39-18S	1153	109732	1.04	98.96
12-18S	2408	61206	3.79	96.21	40-18S	2392	93264	2.5	97.5
13-18S	5572	101882	5.19	94.81	41-18S	1345	59785	2.2	97.8
14-18S	123649	73954	62.57	37.43	42-18S	1467	86189	1.67	98.33
15-18S	6401	87036	6.85	93.15	43-18S	397	26929	1.45	98.55
16-18S	16828	80372	17.31	82.69	44-18S	1670	43811	3.67	96.33
17-18S	97764	227190	30.09	69.91	45-18S	5044	83302	5.71	94.29
18-18S	5795	49804	10.42	89.58	46-18S	2553	114456	2.18	97.82
19-18S	790	41662	1.86	98.14	47-18S	21046	85634	19.73	80.27
20-18S	664	82684	0.8	99.2	48-18S	10000	55794	15.2	84.8
21-18S	1851	164459	1.11	98.89	49-18S	16420	89012	15.57	84.43
22-18S	1151	84953	1.34	98.66	50-18S	7053	74155	8.69	91.31
23-18S	2940	186725	1.55	98.45	51-18S	14674	94771	13.41	86.59
24-18S	9571	68886	12.2	87.8	52-18S	36756	53181	40.87	59.13
25-18S	3268	165247	1.94	98.06	53-18S	55892	29284	65.62	34.38
26-18S	2766	72852	3.66	96.34	54-18S	3622	83173	4.17	95.83
27-18S	5146	131498	3.77	96.23	NEG_PCR_1-18S	70	14484	0.48	99.52
28-18S	17916	75707	19.14	80.86	NEG_PCR_2-18S	76	244	23.75	76.25

Además, hemos expresado los datos obtenidos con el programa, BOWTIE2 también mediante una representación gráfica absoluta y relativa (Figura 4).



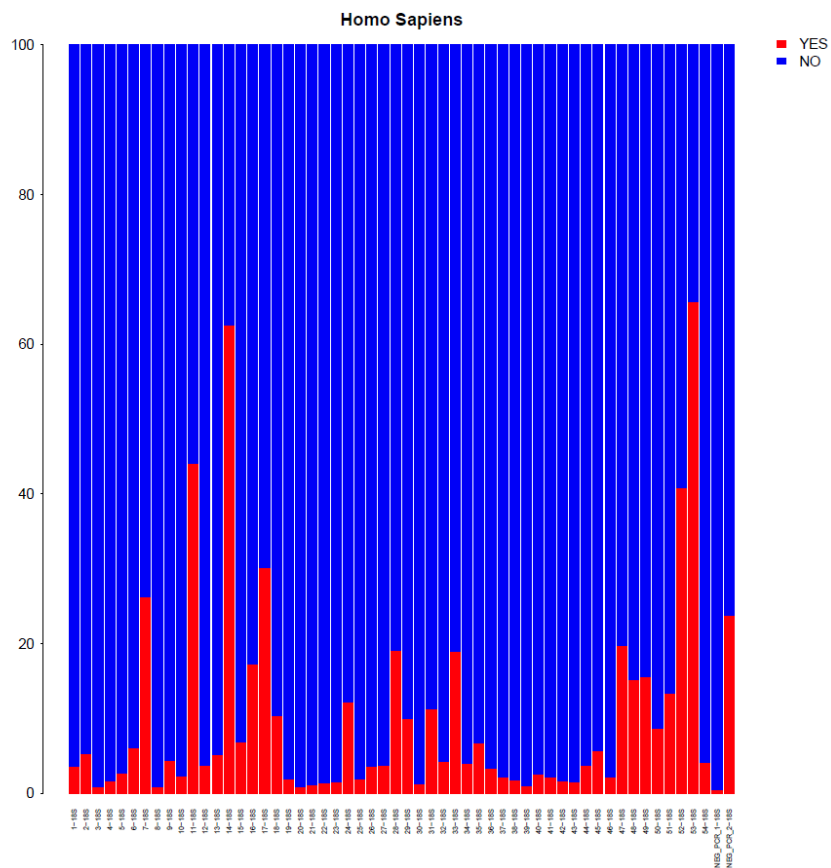
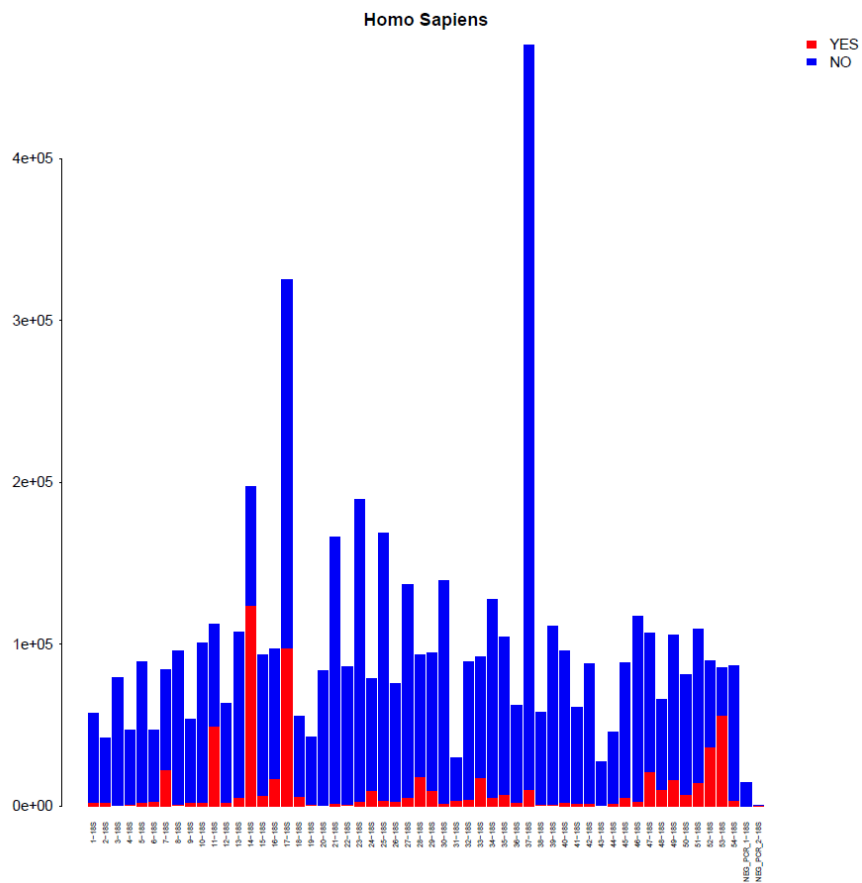


Figura 4. Representación absoluta (a) y relativa (b) del número de lecturas de origen humano en muestras de biopsia de pulmón filtradas por BOWTIE2.

Una vez identificadas las secuencias de origen humano, éstas fueron eliminadas y las secuencias que no se alinearon con el genoma humano se alinearon con una base de datos de referencia de las regiones ITS (hongos) pertenecientes a organismos conocidos, con el programa RDP CLASSIFIER, calculando además cuántas secuencias se alinean con cada uno de los organismos. En este caso, sólo queríamos saber del total de secuencias cuántas pertenecían al organismo *Pneumocystis jirovecii* (Tabla 3).

Tabla 3. Número de lecturas de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de biopsia de pulmón. Marcadas en rojo se encuentran las muestras con más del 80% de lecturas correspondientes *Pneumocystis*, aquellas muestras con un porcentaje de lecturas menor al 1% están marcadas en azul.

SAMPLE	YES	NO	pctYES	pctNO	SAMPLE	YES	NO	pctYES	pctNO
1-18S	247	55073	0.45	99.55	29-18S	8238	77004	9.66	90.34
2-18S	198	39699	0.5	99.5	30-18S	1585	135770	1.15	98.85
3-18S	635	77714	0.81	99.19	31-18S	19250	7200	72.78	27.22
4-18S	185	45966	0.4	99.6	32-18S	76445	8577	89.91	10.09
5-18S	542	86102	0.63	99.37	33-18S	36952	37867	49.39	50.61
6-18S	67	43814	0.15	99.85	34-18S	98335	24028	80.36	19.64
7-18S	21	61985	0.03	99.97	35-18S	312	97059	0.32	99.68
8-18S	699	94068	0.74	99.26	36-18S	37531	22633	62.38	37.62
9-18S	77	51048	0.15	99.85	37-18S	1774	458270	0.39	99.61
10-18S	204	98245	0.21	99.79	38-18S	55669	1239	97.82	2.18
11-18S	100	62646	0.16	99.84	39-18S	1027	108705	0.94	99.06
12-18S	110	61096	0.18	99.82	40-18S	327	92937	0.35	99.65
13-18S	169	101713	0.17	99.83	41-18S	28357	31428	47.43	52.57
14-18S	61	73893	0.08	99.92	42-18S	5777	80412	6.7	93.3
15-18S	218	86818	0.25	99.75	43-18S	24407	2522	90.63	9.37
16-18S	143	80229	0.18	99.82	44-18S	11506	32305	26.26	73.74
17-18S	55	227134	0.02	99.98	45-18S	244	83058	0.29	99.71
18-18S	95	49709	0.19	99.81	46-18S	71566	42890	62.53	37.47
19-18S	38830	2832	93.2	6.8	47-18S	60973	24661	71.2	28.8
20-18S	693	81991	0.84	99.16	48-18S	297	55497	0.53	99.47
21-18S	5152	159307	3.13	96.87	49-18S	28941	60071	32.51	67.49
22-18S	573	84380	0.67	99.33	50-18S	70221	3934	94.69	5.31
23-18S	1556	185169	0.83	99.17	51-18S	43367	51404	45.76	54.24
24-18S	464	68422	0.67	99.33	52-18S	214	52967	0.4	99.6
25-18S	27870	137377	16.87	83.13	53-18S	168	29116	0.57	99.43
26-18S	62688	10164	86.05	13.95	54-18S	18942	64231	22.77	77.23
27-18S	8090	123408	6.15	93.85	NEG_PCR_1-18S	67	14417	0.46	99.54
28-18S	28986	46721	38.29	61.71	NEG_PCR_2-18S	57	187	23.36	76.64

Además, hemos expresado los datos obtenidos con el programa, RDP Classifier también mediante una representación gráfica absoluta y relativa (Figura 5).

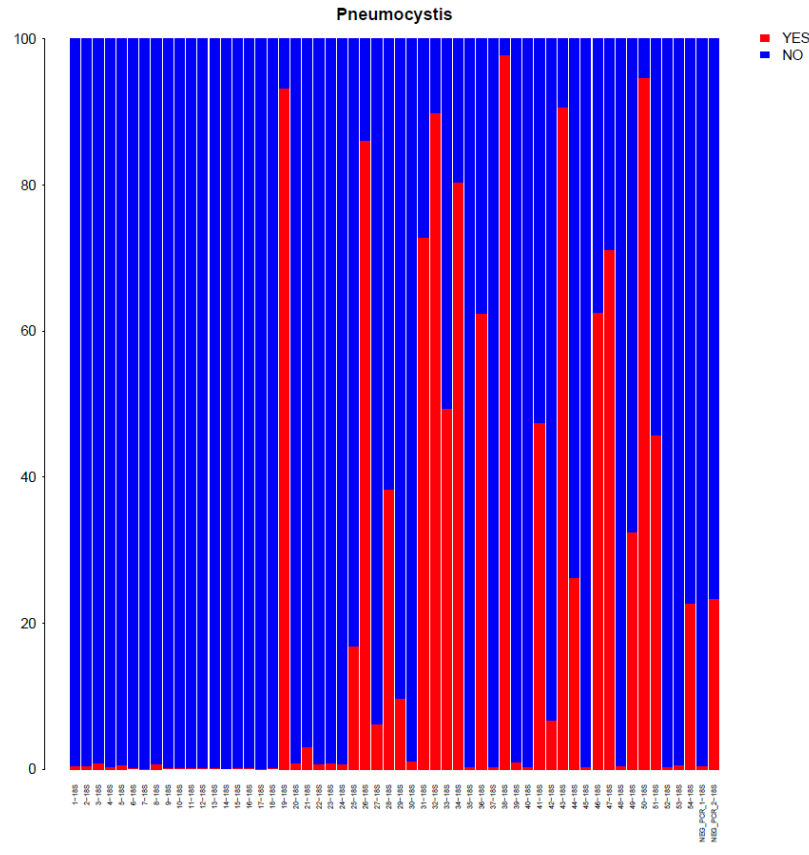
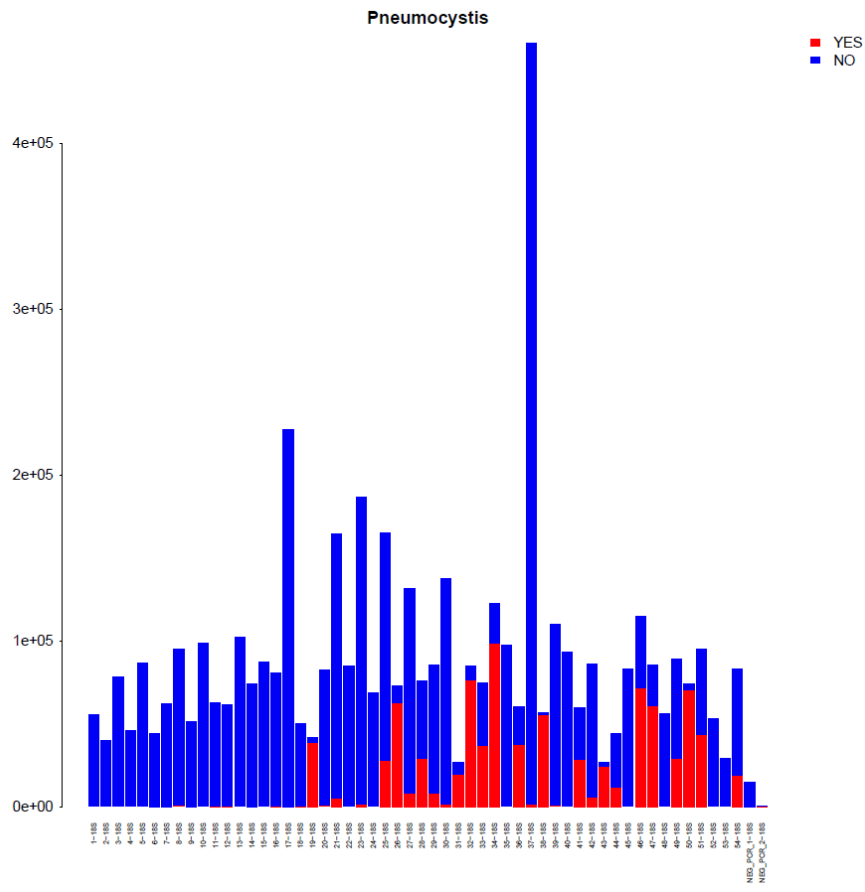


Figura 5. Representación absoluta (a) y relativa (b) del número de lecturas de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de biopsia de pulmón identificadas por RDP Classifier.

Se realizó un perfil taxonómico con las frecuencias absolutas y relativas de los géneros fúngicos encontrados en cada una de las biopsias (Figura 6). En la tabla de datos clínicos (Capítulo 1, Tabla 6) se identificaron cuatro individuos (3, 37, 38 y 45) con inflamación pulmonar (marcados con asterisco negro en la Figura 19) y dos individuos (2 y 49) con diagnóstico de bronconeumonía (marcados con asterisco rojo en la Figura 20), 36,89% de lecturas del individuo 2 (biopsia negativa para *Pneumocystis jirovecii*) fueron de *Aspergillus terreus* y 34,76% fueron de *Malassezia globosa*, el individuo 3 (biopsia negativa para *Pneumocystis jirovecii*) presentó un 90,76% de lecturas correspondientes a *Saccharomycetales*, 73,7% de lecturas del individuo 37 (biopsia positiva para *Pneumocystis jirovecii*) fueron de *Cándida*, el individuo 38 (biopsia positiva para *Pneumocystis jirovecii*) presentó un 99,59% de lecturas correspondientes de *Pneumocystis jirovecii*, el individuo 45 (biopsia positiva para *Pneumocystis jirovecii*) presentó un 80,65% de lecturas correspondientes a *Phaeoacremonium tuscanum* y el 32,51% de lecturas del individuo 49 (biopsia positiva para *Pneumocystis jirovecii*) fueron de *Pneumocystis jirovecii*.

*Aspergillus terreus* es un hongo ambiental que en pacientes inmunocomprometidos puede llegar a causar infecciones, además es un hongo altamente resistente a antifúngicos, sin embargo se ha descrito que esta especie solo causa un 3-12.5% de las infecciones por *Aspergillus* (Steinbach *et al.*, 2004). El género *Malassezia* consiste en hongos que se encuentran de manera natural en el microbioma de la piel, por lo general se lo asocia con infecciones dérmicas pero en pacientes inmunocomprometidos puede llegar a generar infecciones pulmonares y sistémicas graves (Gaitanis *et al.*, 2012). *Cándida* es la causante de Candidiasis esta infección tiene una mortalidad de entre el 30 y el 50% y sigue siendo una amenaza de salud a nivel mundial (Misme-Aucouturier *et al.*, 2017). Las especies del género *Phaeoacremonium* están por lo general relacionadas a enfermedades en plantas, algunas especies del genero han sido descritas como causantes de infecciones dérmicas en humanos (Gramaje *et al.*, 2015).

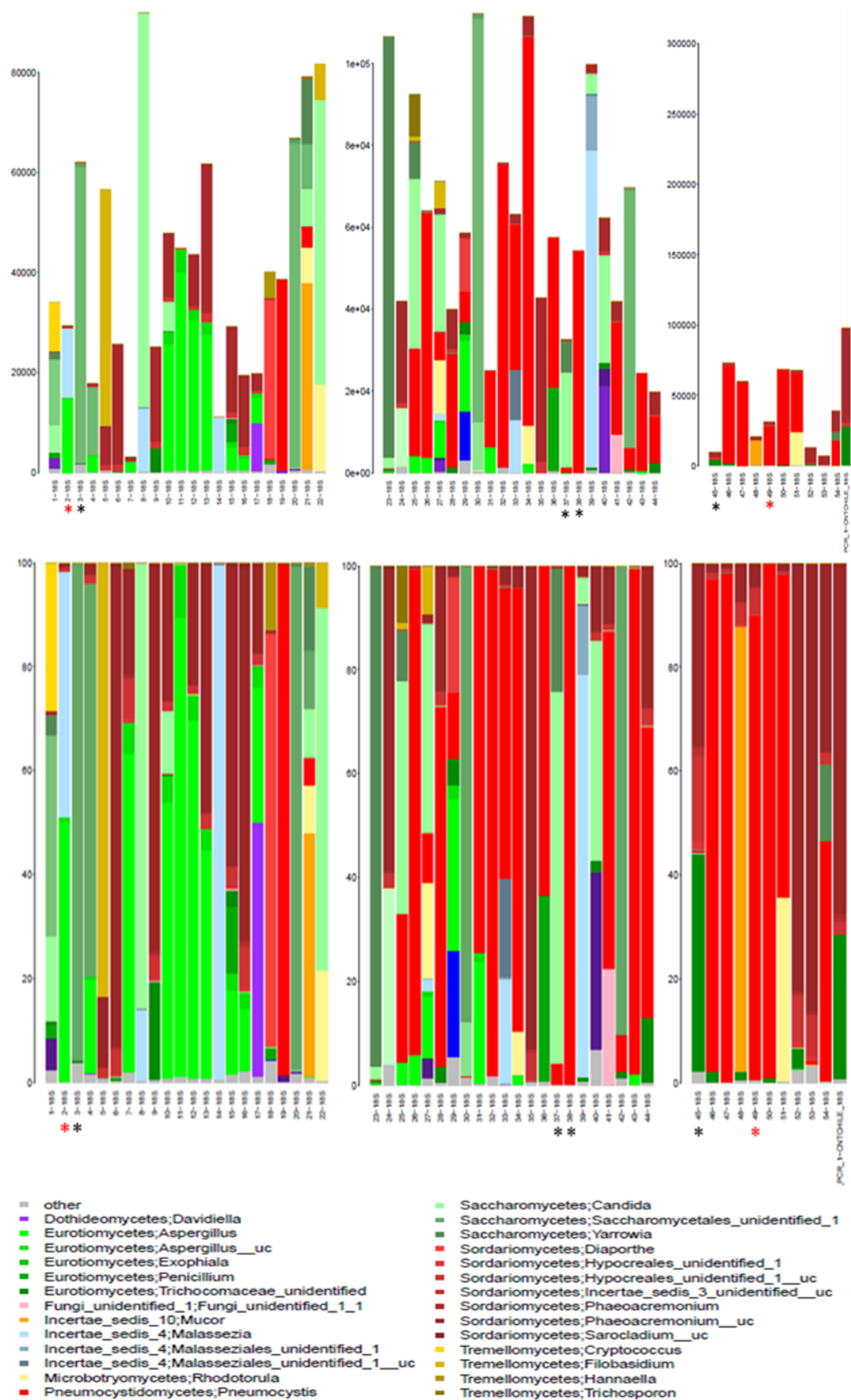


Figura 6. Frecuencias absolutas y relativas de los géneros fúngicos encontrados en muestras de biopsia de pulmón.

Además se relacionaron el número de lecturas correspondientes a *Pneumocystis jirovecii* de cada muestra con el valor Ct y el número de copias de MSG obtenidas por la real-time PCR para MSG tipo A (Capítulo 1) y se determinó que existe una relación inversa entre el valor de ciclo umbral calculado y la cantidad de lecturas del hongo (Tabla 4), 13 de las muestras analizadas (20, 22, 23, 24, 30,35,37, 39, 40, 45, 48, 52 y 53) mostraron un porcentaje de lecturas correspondientes a *P. jirovecii* igual o menor al 1% (marcadas en amarillo), las mismas muestras mostraron los valores de Ct más altos del lote completo (entre 36.31±0.20 y 40.00±0.00).

Tabla 4. Valor Ct, número de copias de MSG tipo A y número de lecturas correspondientes a *Pneumocystis jirovecii* en muestras de biopsia de pulmón.

Muestra	Media Ct	Número de copias	% lecturas pneumocystis
19	28,33±0,16	394.77	93.2
20	37,19±0,11	1.3	0.84
21	26,82±0,08	1102.03	3.13
22	37,19±0,27	1.17	0.67
23	34,92±0,16	5.5	0.83
24	36,85±0,33	1.41	0.67
25	30,48±0,03	106.45	16.87
26	29,62±0,08	180.66	86.05
27	32,24±0,11	32.42	6.15
28	34,32±0,15	8.18	38.29
29	35,76±0,32	2.88	9.66
30	37,88±0,13	0.82	1.15
31	33,35±0,11	15.66	72.78
32	29,98±0,13	138.07	89.91
33	33,65±0,31	11.34	49.39
34	30,08±0,18	124.74	80.36
35	38,56±0,49	0.42	0.32
36	33,50±0,78	9.23	62.38
37	34,24±0,66	6.15	0.39
38	32,14±0,11	34.33	97.82
39	38,82±1,04	0.25	0.94
40	36,64±0,09	1.89	0.35
41	32,77±0,01	24.33	47.43
42	32,77±0,08	23.23	6.7
43	28,83±0,12	293.39	90.63
44	35,39±0,10	4.21	26.26
45	37,49±0,34	0.92	0.29
46	31,18±0,76	42.29	62.53
47	34,77±0,94	3.66	71.2
48	39,61±0,55	0.2	0.53
49	35,62±1,39	1.57	32.51
50	33,40±2,06	4.28	94.69
51	34,40±0,57	5.91	45.76
52	40,0±0,00	0.23	0.4
53	36,31±0,20	2.17	0.57
54	34,22±0,30	7.89	22.77

Se determinó además que las cuatro muestras (22, 24, 30 y 35) que presentaron problemas en su amplificación (Capítulo 1) forman parte del grupo de muestras con baja cantidad de lecturas correspondientes a *Pneumocystis jirovecii* y un valor Ct alto. Se decidió entonces confirmar que el producto de la amplificación de estas muestras sea del hongo y no sea un producto inespecífico. Para ello se clonaron los productos de amplificación de estas cuatro muestras.

### 3.3. Clonación y secuenciación de muestras con bajo número de lecturas de *Pneumocystis jirovecii*.

Los productos de amplificación de las muestras 22, 24, 30 y 35 que presentaron problemas de detección con un bajo porcentaje de lecturas correspondientes a *Pneumocystis jirovecii* y un valor del ciclo umbral alto se clonaron en el vector pGEM T easy. Estos vectores recombinantes se transformaron en células competentes de *E. coli* y un total de 93 colonias fueron seleccionadas mediante cribado blanco/azul (20 colonias de la muestra 22, 25 colonias de la muestra 24, 21 colonias de la muestra 30 y 27 colonias de la muestra 35). Los plásmidos fueron extraídos utilizando un kit comercial y secuenciados en ambas direcciones. De estas solamente 17 (18,28%) mostraron secuencias de *Pneumocystis*, el 61.29% presentó secuencias de origen humano y para el 20.43% restante no se pudo determinar el origen de las secuencias obtenidas (Figura 7).

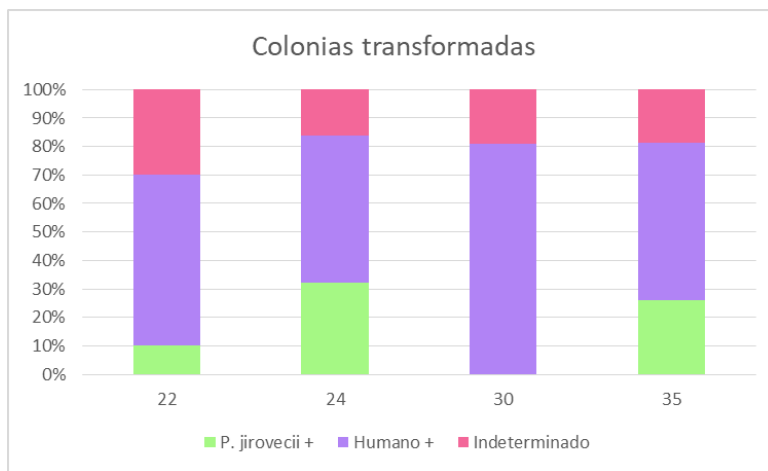


Figura 7. Porcentaje de colonias transformadas positivas para *Pneumocystis jirovecii* a partir de muestras de biopsia de pulmón. Las muestras se seleccionaron por su alto valor de Ct y su bajo número de lecturas ITS1 para el hongo.

El análisis de las 17 secuencias obtenidas de *Pneumocystis* se realizó con el programa MegaX. Se alinearon las secuencias con aquellas obtenidas para proteínas Msg tipo A por Ma y colaboradores (Ma *et al.*, 2016), el anillamiento confirmó que el producto amplificado es parte de la región 5' de las proteínas Msg tipo A (Figura 8) y que los amplicones obtenidos no son productos inespecíficos. Se secuenciaron como controles.

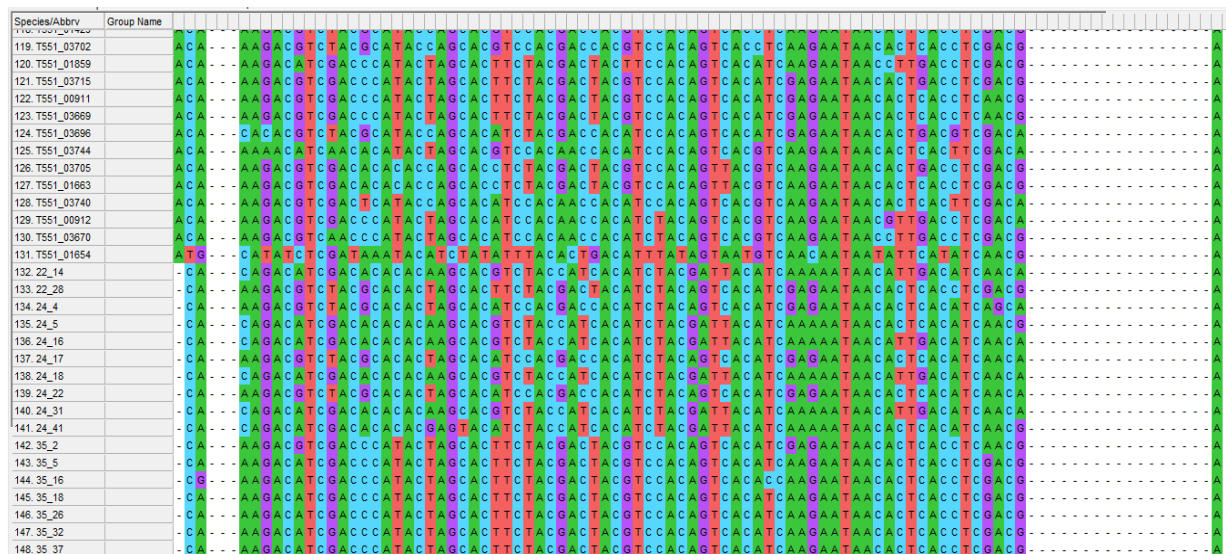


Figura 8. Alineamiento múltiple por ClustalW de los fragmentos de proteínas MSG tipo A obtenidos de la secuenciación de los clones obtenidos de las muestras 22, 24 y 35 y las secuencias de MSG tipo A obtenidas por Ma y colaboradores (Ma *et al.*, 2016) obtenido con el programa MEGAX.

El análisis de variabilidad de las secuencias obtenidas con *Neighbor-joining tree* demostró la alta diversidad de las proteínas no solo entre individuos distintos sino también dentro del mismo individuo (Figura 9).

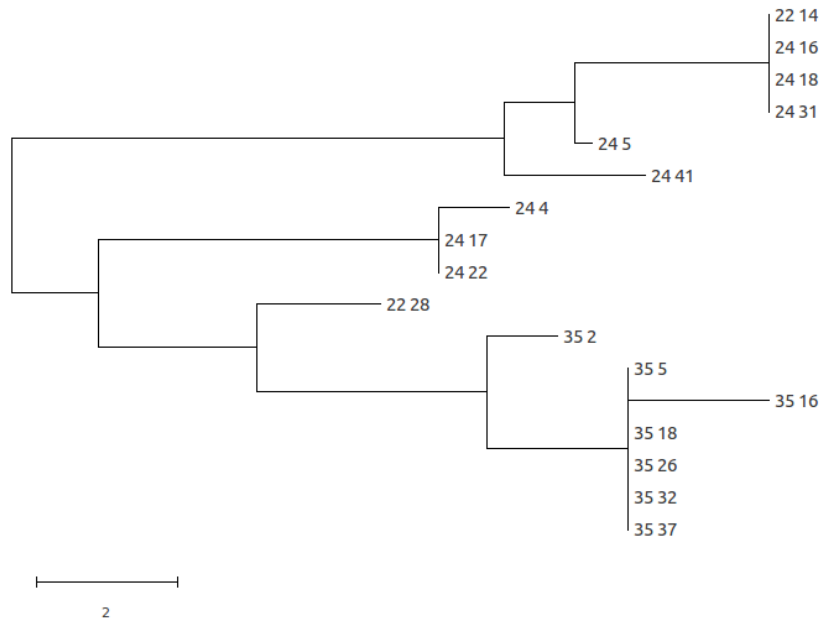


Figura 9. Árbol filogenético Neighbour joining de las proteínas MSG tipo A de los clones de las muestras 22, 24 y 35 por el programa MEGAX.

#### 4. Discusión

Se ha demostrado que la secuenciación de la región ITS1 logra la amplificación de una mayor cantidad de especies de hongos, animales y plantas que la secuenciación de la región ITS2. El contenido de GC en la región ITS1 en la mayoría de grupos taxonómicos es menor lo cual tiene un efecto positivo en la PCR y en la secuenciación. Además, los oligos utilizados para la amplificación de esta zona son universales y logran la amplificación de una mayor cantidad de especies que aquellos utilizados para la zona ITS2. Los análisis taxonómicos con ITS1 han mostrado ser más útil que otros tipos de códigos de barras genéticos como *rbcL*, *matK*, *trnL-F* y *psbA-trnH* (Wang *et al.*, 2014).

La eficiencia de la identificación taxonómica por secuenciación no depende solamente de la longitud de los fragmentos a secuenciar sino también de la calidad de los mismos (Ciardo *et al.*, 2005), el procesamiento de las secuencias previo a la identificación consiste en una serie de pasos informáticos importantes para la determinación taxonómica correcta de los organismos presentes en las muestras. Al ser la secuenciación del ITS1 eficaz no solo para hongos sino también para animales y al realizar esta identificación en muestras de autopsias de pulmón el contenido de secuencias de DNA de humano debería ser una parte mayoritaria de las secuencias obtenidas. El programa BOWTIE 2 permite filtrar las secuencias obtenidas para eliminar las correspondientes al hospedero (humano), eliminando así una gran cantidad de secuencias que no son de interés para el estudio (Langmead, 2009).

El análisis taxonómico por ITS1 realizado de muestras de biopsia de pulmón mostró lecturas de *Pneumocystis jirovecii* en el 100% de las muestras positivas para mtLSU rRNA confirmando así los



resultados del capítulo 1 del presente trabajo. Aunque también en las muestras negativas el programa clasificó algunas secuencias como *Pneumocystis*, esto puede ser debido a alguna pequeña contaminación durante la elaboración de la librería o a que el programa de clasificación RDP Classifier cometa algunos errores.

El número de lecturas obtenidas pertenecientes a *Pneumocystis jirovecii* explica la dificultad al identificar la presencia de MSG tipo A por PCR a tiempo real (Capítulo 1), varios autores han relacionado el número de copias de mtLSU rRNA identificadas con la carga fúngica del paciente (Maillet *et al.*, 2014; Issa *et al.*, 2018) por lo que se puede asumir que algunas muestras (22, 24, 30 y 35) presentaron dificultad al amplificarse por el bajo título de *Pneumocystis* presente en la muestra. En estos casos la probabilidad de haberse amplificado en la PCR cuantitativa productos inespecíficos era alta por lo que se procedió a la clonación y subsiguiente secuenciación de los mismos. Esta secuenciación demostró que los productos identificados en el capítulo 1 tenían dos orígenes, por un lado, se identificaron varias secuencias de origen humano, al ser muestras de biopsias de pulmón este resultado es lógico, la cantidad de DNA del huésped en este tipo de muestras es alto. Por otro lado, se encontraron fragmentos de MSG tipo A de *Pneumocystis jirovecii* siendo este el resultado esperado. Se sospecha además que estos pacientes con una carga baja de *Pneumocystis* no presentaban infección activa (PcP) sino solamente una colonización por el hongo, por los valores de Ct altos obtenidos en las PCRs. La secuenciación de otros productos de amplificación como el del paciente 19, sólo obtuvo secuencias *Pneumocystis*, por lo que la amplificación de secuencias inespecíficas solamente se da en casos donde el título del hongo es muy bajo.

## Capítulo 3.

### 1. Introducción

Parece ser que la creencia de que el hongo coloniza a un individuo en los primeros años de vida y es capaz de causar neumonía solamente cuando el sistema inmune se ve comprometido cada vez tiene más evidencias en contra, por otro lado, la idea de que PcP se produce por lo general por infecciones *de novo* no relacionadas con el contacto primario en la infancia cada vez muestra más evidencia a favor (de Boer *et al.*, 2018; C. F. J. Thomas & Limper, 2007). Sin embargo, la hipótesis de que los niños colonizados con *P. jirovecii* podrían estar actuando como un reservorio para el microorganismo es interesante, la hipótesis está sustentada por el hecho de que a los 20 meses de edad el 85% de infantes presentan anticuerpos para el organismo (Calderón-sandubete *et al.*, 2011), además personas inmunocompetentes colonizadas por *Pneumocystis* pero sin sintomatología de infección podrían ser reservorios temporales y posibles transmisores del hongo (Iturra *et al.*, 2018).

Como ya hemos mencionado, se han evaluado diferentes técnicas moleculares de diagnóstico y en el caso de la PCR a tiempo real algunos autores pretenden diferenciar, mediante cuantificación, entre una colonización y una infección activa (Flori *et al.*, 2004). Otros, han establecido que valores de Ct iguales o inferiores a 25 se deben de considerar PcP, mientras que superiores a 25 deben considerarse como colonizados por *Pneumocystis* (Rudramurthy *et al.*, 2018). Nosotros, en cambio, en este último capítulo intentaremos discriminar una infección activa detectando mensajeros de RNA de, al menos, dos genes de *Pneumocystis*.

### 2. Materiales y Métodos

#### 2.1. Muestras biológicas.

En este estudio se incluyeron muestras procedentes de dos ensayos y localizaciones geográficas diferentes. El primer lote de muestras fueron las muestras de pulmón procedentes de autopsias de niños fallecidos, en su mayoría, por el Síndrome de Muerte Súbita del Lactante (SMSL) en Chile entre los años 2001-2004. Estas muestras contenían ácidos nucleicos totales, tanto DNA como RNA. El otro grupo de muestras, eran un total de 4 muestras de aspirados nasales de niños de Mozambique con VIH y positivos para PcP que fueron proporcionados por el Dr. Enrique Calderón, Médico Especialista en Medicina Interna en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y Jefe del grupo de investigación CIBER “Epidemiología y Salud” en el Instituto de Biomedicina de Sevilla.

#### 2.2. Extracciones de RNA.

En el caso de las muestras procedentes de autopsias de niños, las extracciones se realizaron en Chile y se enviaron a España. Todas contenían DNA y RNA por lo que sólo se trataron 25µl de la extracción con 0,5µl de DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su uso.

Por otro lado, se extrajo el RNA de 250 µl de los aspirados nasales en el laboratorio con el kit comercial Power Microbiome (MOBio) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, 25 µl de los extractos fueron tratados con 0.5 µl de DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las alícuotas se cuantificaron y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **2.3. RT-PCR convencional en un solo tubo.**

Para la obtención del cDNA se realizó la retrotranscripción y la PCR en un solo tubo. Los oligos utilizados para amplificar el RNA mensajero de los genes de las MSG tipo A fueron PNEU3F y PNEU2R y para amplificar el RNA mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) fueron PAZ102E y PAZ102H. Se preparó el Mix A que contenía en un volumen final de 10µl: 1µl de cada cebador (10 µM), 3µl de agua ultra pura y 5µl de RNA, y a continuación se incubó a 95°C durante 10 minutos. El segundo mix (Mix B) se preparó en un volumen final de 25µl, que contenía: 12,5µl de GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), 0,3µl de SuperScript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), 0,3µl de RNaseOUT (ThermoFisher Scientific), 1,9µl de agua ultra pura y los 10µl del Mix A incubados a 95°C. El programa térmico para ambas combinaciones incluyó una etapa de preincubación inicial de 42°C por 45 minutos seguida por 10 minutos a 95°C, una etapa de amplificación de 45 ciclos en el que cada ciclo consistía en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 1,20 minutos a 72°C, por último, se incluyó un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. La síntesis de productos de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante la separación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% en el caso de MSG y 0.8% en el caso de mtLSU rRNA. En el caso de la amplificación del mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) esta primera RT-PCR sirvió como molde para la segunda ronda de PCR con los oligos internos PAZ102X y PAZ102Y.

### **2.4. RT-PCR cuantitativa a tiempo real.**

La RT-PCR a tiempo real se llevó a cabo en la plataforma LightCycler® 480 Instrument II (Roche) utilizando placas multipocillo de 96 pocillos. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10µl que contenían: 5µl de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,3µl de cada cebador (10µM), 0,1µl de enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), 0,1µl de RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific) y 4,2µl de RNA. De igual forma que en el apartado anterior los oligos utilizados para amplificar el RNA mensajero de los genes de las MSG tipo A fueron PNEU3F y PNEU2R y para amplificar el RNA mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) fueron PAZ102E y PAZ102H. Se incluyeron controles en los que no se añadió la retrotranscriptasa para confirmar la detección a partir de RNA.

El programa térmico incluyó una etapa de transcripción reversa de 48°C por 30 minutos seguida de una desnaturalización inicial a 95°C durante 5min, una etapa de amplificación de 45 ciclos en el que cada ciclo consistía en 2 segundos a 95°C, 5 segundos a 60, o 58 y 15 segundos a 72°C, una etapa de melting de un minuto a 95°C, 1 minuto a 40°C, un segundo a 70°C, por último, se incluyó un paso de enfriamiento a 40°C por 30 segundos. La síntesis de productos de cDNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler y mediante la separación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% en el caso de MSG y 0.8% en el caso de mtLSU rRNA. En el caso de la amplificación del mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) esta primera RT-PCR sirvió como molde para la segunda ronda de PCR con los oligos internos PAZ102X y PAZ102Y.

## **3. Resultados.**

### **3.1. Detección de infección activa mediante RT-PCR convencional.**

Para poder discriminar una infección activa (PcP) de una colonización intentamos relacionar la detección de ambos RNA mensajeros de *Pneumocystis* (mtLSU rRNA, MSG RNA) en pacientes positivos para neumonía PcP. En una infección activa *Pneumocystis* varía la expresión de las Msg para evadir los

mecanismos de defensa del huésped (Emanuel Schmid-Siegert *et al*, 2017), además estas son las proteínas más expresadas por lo que deberíamos poder detectar sus RNAs mensajeros.

La RT-PCR con los oligos PNEU3F y PNEU2R fue negativa para todas las muestras de autopsias positivas para *Pneumocystis* (muestras 19-54), no observándose amplificación de ningún producto (Figuras 1, 2 y 3). Al igual con los 4 aspirados nasales de Mozambique, PcP positivos (muestras 370, 391, 491 y 516) en los cuales no se observó amplificación (Figura 4).

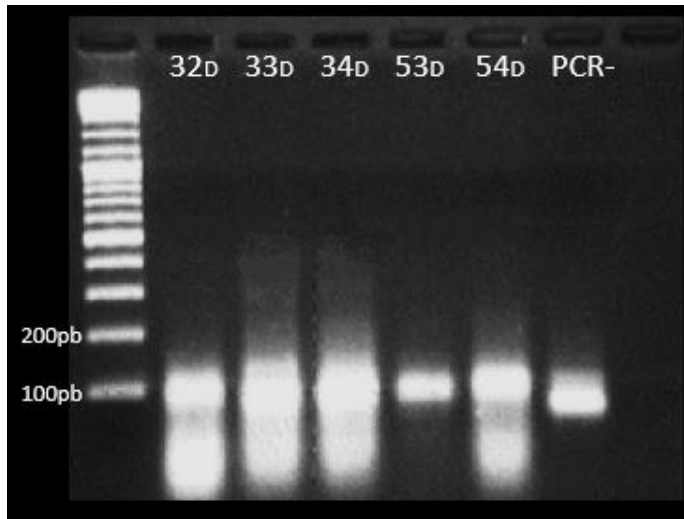


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras de biopsia de pulmón 32, 33, 34, 53 y 54 tratadas con DNasa mediante RT-PCR MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

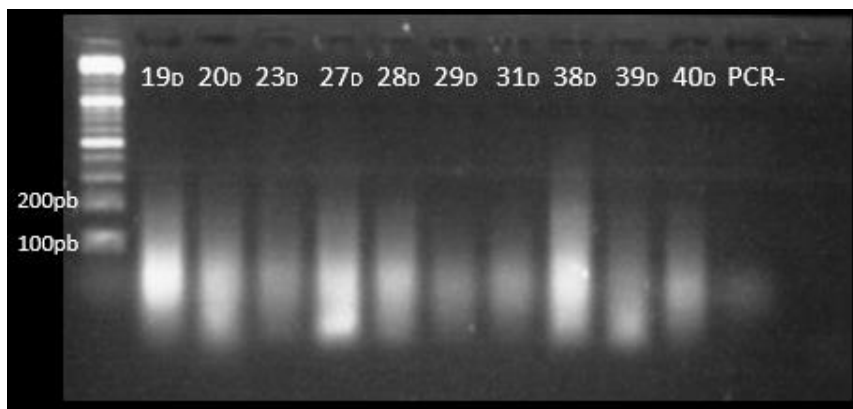


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras de biopsia de pulmón 19, 20, 23, 27, 28, 29, 31, 38, 39 y 40 tratadas con DNasa mediante RT-PCR MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

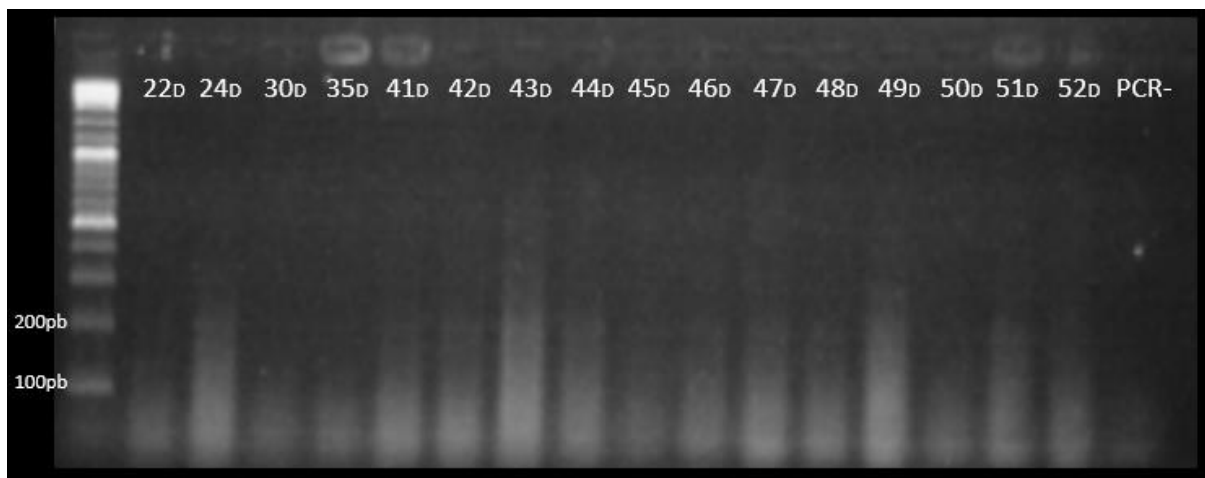


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras de biopsia de pulmón 22, 24, 30, 35, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52 tratadas con DNasa mediante RT-PCR MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

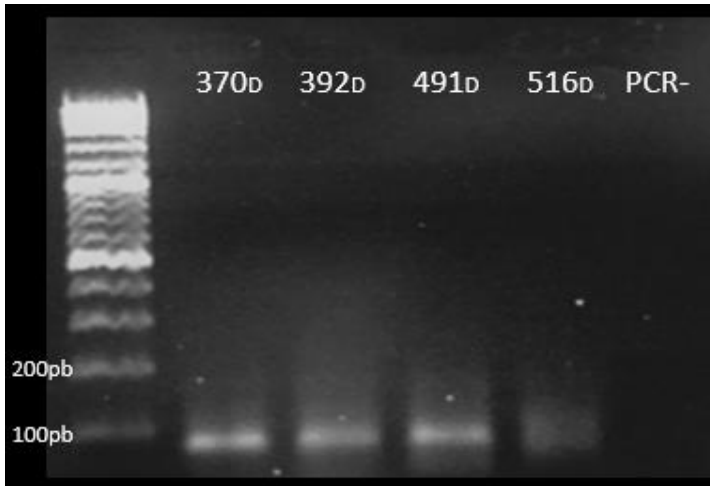


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras de aspirados nasales 370, 392, 491 y 516 tratadas con DNasa mediante RT-PCR MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

Sin embargo, en todas aquellas muestras en las que se intentó detectar el RNA mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) mediante RT-PCR convencional de autopsias positivas para *Pneumocystis* (32, 33, 34, 53 y 54) el resultado fue positivo, generando una única banda de amplificación alrededor de las 360pb (Figura 5). Los controles sin retrotranscripción confirmaron que la amplificación provenía de RNA y no de DNA que hubiera quedado presente en la muestra a pesar del tratamiento con DNasa.

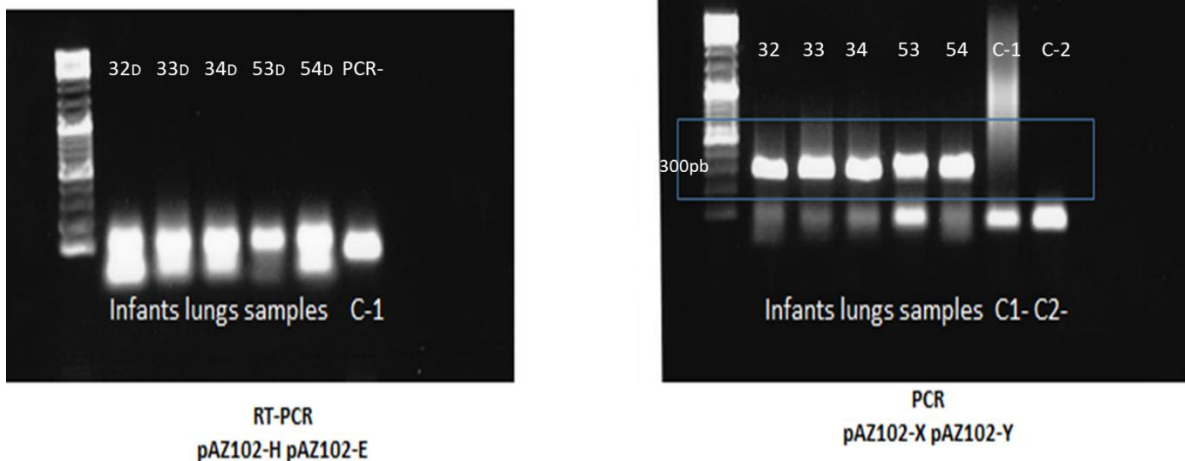


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del 0.8% de los productos de amplificación obtenidos de la primera ronda (izquierda) y segunda ronda (derecha) de muestras de biopsia de pulmón 32, 33, 34, 53 y 54 tratadas con DNasa mediante RT-PCR anidada para mtLSU rRNA. Para la primera ronda de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102E y PAZ102H y para la segunda ronda de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102X y PAZ102Y.

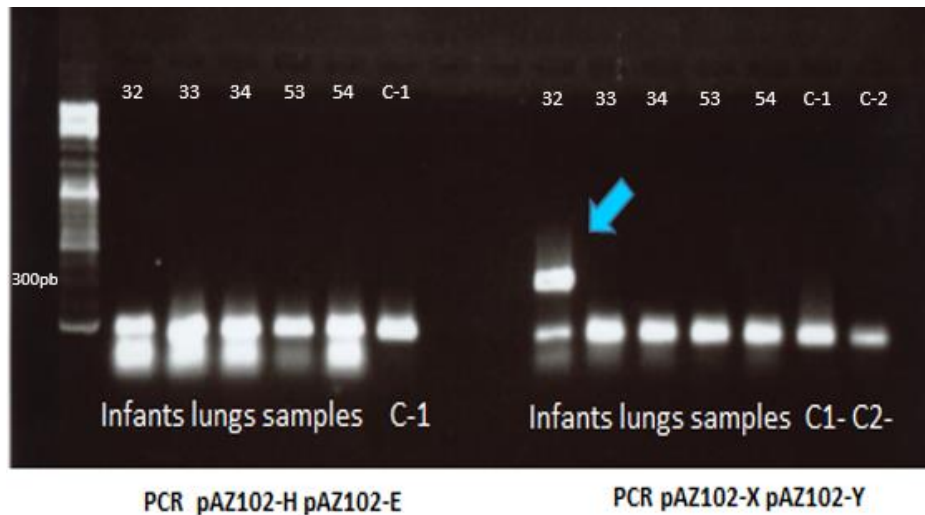


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del 0.8% de los productos de amplificación obtenidos de la primera ronda (izquierda) y segunda ronda (derecha) de muestras de biopsia de pulmón 32, 33, 34, 53 y 54 no tratadas con DNasa mediante PCR anidada para mtLSU rRNA. Para la primera ronda de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102E y PAZ102H y para la segunda ronda de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102X y PAZ102Y.

Sólo en la muestra 32 se detectó amplificación del producto específico, confirmando que en la muestra 32, a pesar del tratamiento con DNasa, el DNA no fue eliminado completamente (Figura 6). En el resto de muestras no se generó ninguna banda como se esperaba.

Se seleccionaron dos de los aspirados de Mozambique tratados con DNasa (muestras 491 y 516) y se realizó una RT-PCR convencional para mtLSU rRNA, se utilizaron como controles positivos las muestras de DNA no tratado con DNasa, en este caso se logró observar la amplificación en los controles positivos, pero no se vio amplificación del mensajero confirmando así la efectividad del protocolo de PCR (Figura 7).

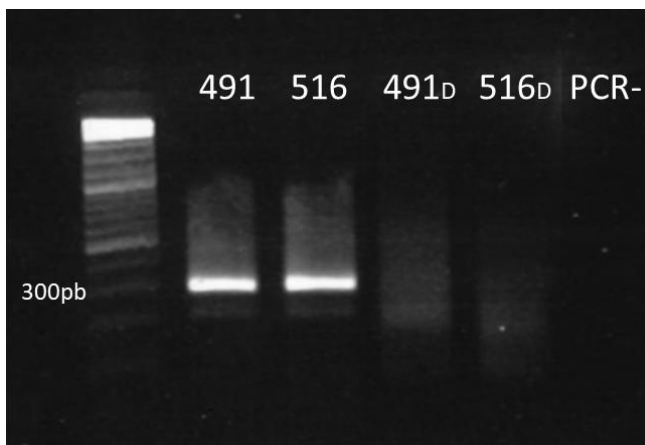


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del 0.8% de los productos de amplificación obtenidos de segunda ronda de RT-PCR anidada para mtLSU rRNA de muestras de aspirados nasales 491 y 516 tratadas y sin tratar DNasa. Para la primera ronda (no mostrada) de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102E y PAZ102H y para la segunda ronda de PCR se utilizaron los cebadores PAZ102X y PAZ102Y.

De momento, sólo hemos conseguido detectar la expresión de mtLSUr RNA, pero no del MSG RNA. Esta parte la seguiremos desarrollando en el laboratorio de Genómica del FISABIO.

### 3.2. Detección de infección activa mediante RT-PCR a tiempo real.

La segunda estrategia probada para discriminar una infección activa (PcP) de una colonización fue mediante una RT-PCR a tiempo real, para esta intentamos nuevamente detectar ambos RNA mensajeros de *Pneumocystis* (mtLSUr RNA, MSG RNA) en pacientes positivos para colonización por *Pneumocystis* con neumonía PcP.

La RT-PCR a tiempo real con los oligos PNEU3F y PNEU2R fue negativa para 5 muestras de autopsias positivas para *Pneumocystis* (21, 25, 26, 36 y 37), no observándose amplificación de ningún producto (Figura 8).

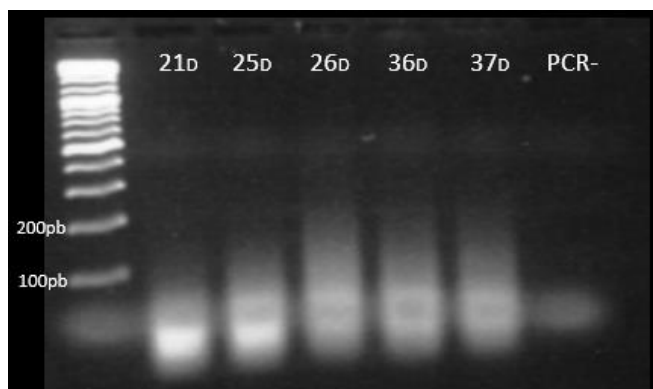


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de las muestras de biopsia de pulmón 21, 25, 26, 36 y 37 tratadas con DNasa mediante RT-PCR a tiempo real para MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

Se realizó el protocolo para los 4 aspirados nasales de Mozambique, PcP positivos (muestras 370, 391, 491 y 516). En este caso se incluyeron además muestras de DNA (sin tratamiento con DNasa) positivas para *Pneumocystis* como controles positivos de amplificación. Se observó una banda única del tamaño esperado (117pb) en todas las muestras de DNA confirmando la capacidad de amplificación del protocolo, las muestras de RNA (DNA free), por otro lado, no presentaron ningún amplificado para MSG tipo A (Figura 9).

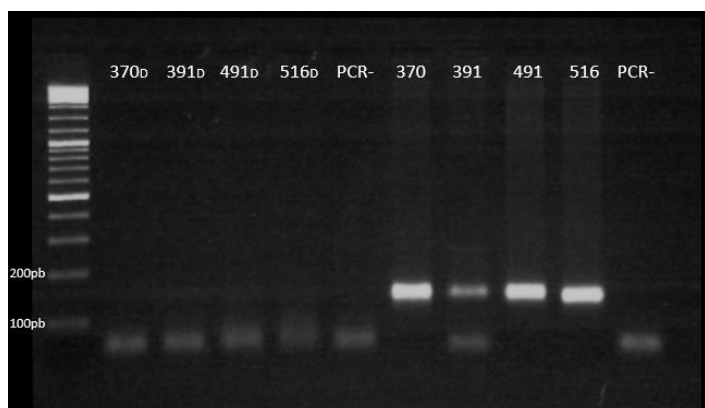


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos de muestras de aspirados nasales 370, 392, 491 y 516 tratadas y sin tratar con DNasa mediante RT-PCR a tiempo real para MSG utilizando los cebadores PNEU3F y PNEU2R.

## 4. Discusión

Actualmente no existe un método de diagnóstico clínico que permita diferenciar un individuo colonizado de un paciente con neumonía causada por el hongo. La PcP tiene, como se ha descrito anteriormente, síntomas genéricos similares a otras muchas infecciones e inflamaciones pulmonares no relacionadas con *Pneumocystis* (White *et al.*, 2017). Como se ha descrito, además, individuos que

no presentan PcP pero han sido colonizados por el hongo podrían ser reservorios temporales y transmisores de la enfermedad (Cushion, 2004; Iturra *et al.*, 2018). Es por esto que es importante el desarrollo de un método de diagnóstico que permita la diferenciación entre individuos con una infección activa por *Pneumocystis* e individuos colonizados, pero no PcP.

Diferentes autores han propuesto maneras cuantitativas de discriminar una neumonía por *Pneumocystis jirovecii* de una colonización sin infección activa por el hongo (Flori *et al.*, 2004; Rudramurthy *et al.*, 2018), haciendo uso del valor Ct obtenido (se considera PcP con valores inferiores o iguales a 25). Todas las muestras evaluadas en este trabajo obtuvieron valores superiores a 25. Sin embargo, existen hipótesis que afirman que la enfermedad se manifiesta en individuos que tienen factores de riesgo, como un recuento bajo de linfocitos (de Boer, Walzer, & Mori, 2018; Dhami & Cermakova, 2015). Por lo que se podría suponer que la cantidad del hongo presente en los pulmones de los pacientes no siempre está relacionada con la presencia de la enfermedad, además, en el caso de muestras de biopsia de pulmón la cantidad de *P. jirovecii* detectado varía según la región del pulmón del que se haya tomado la biopsia ya que la distribución del hongo no es uniforme en todas las zonas del pulmón (de Souza & Benchimol, 2005).

En este estudio se intentó discriminar a los pacientes de PCP por la identificación del RNA mensajero tanto de las Msg tipo A como de mtLSU rRNA basándonos en el principio de que en una infección activa *Pneumocystis* las MSG son las proteínas más expresadas en el hongo, por esto deberíamos ser capaces de detectar sus RNAs mensajeros. Ambos protocolos de detección fueron capaces de detectar el RNA mensajero de mtLSU rRNA lo que confirma que la retrotranscripción fue eficaz, sin embargo, el mensajero de MSG tipo A no se pudo detectar en ninguno de los casos.

Los genes codificantes de las proteínas Msg presentan entre uno y dos intrones en su secuencia, pero éstos están ubicados en la región 5' del gen (Emanuel Schmid-Siegert *et al.*, 2017) y nuestro protocolo de PCR amplifica una región semiconservada de la zona 3' del gen lo que descarta la posibilidad de que los oligos, al haber sido diseñados para DNA, anillen en una región no codificante del gen y por tanto no sean capaces de amplificar el producto de interés a partir de cDNA pero si de DNA.

En ambos casos el proceso completo se realiza en un solo tubo, utilizando todo el cDNA generado para su posterior amplificación. También permite un procesamiento rápido y minimiza el riesgo de contaminación. El grupo de investigación seguirá, en trabajos posteriores, desarrollando estos métodos hasta ponerlos a punto.



## Conclusiones

Del estudio realizado se puede concluir que:

1. Se ha desarrollado un protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real que permite estimar de forma fiable el número de copias de DNA de MSG tipo A de *Pneumocystis jirovecii* en extractos de DNA en biopsias de pulmón de pacientes infectados con o sin diagnóstico de PcP.
2. Se confirmó la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en todas las muestras que mostraron amplificación de MSG tipo A con el protocolo de PCR a tiempo real desarrollado mediante la secuenciación de la región ITS1.
3. Se determinó que es posible la detección de productos de amplificación de *Pneumocystis jirovecii* incluso en muestras con un porcentaje bajo (menor al 1%) de lecturas de ITS1 correspondientes al hongo, demostrando así la elevada sensibilidad del nuevo método de diagnóstico.
4. Aunque la mayoría de los niños fallecidos por muerte súbita del lactante tenían niveles de *Pneumocystis* bajos, la presencia del hongo en 36 de ellos puede evidenciar alguna relación.
5. No fue posible la amplificación de MSG tipo A a partir del RNA mensajero en muestras de biopsia de pulmón y aspirados nasales. En cambio, la amplificación del RNA mensajero del gen mitocondrial de la subunidad larga ribosomal (mtLSU rRNA) mediante RT-PCR convencional se amplificó en todos los casos.
6. La secuenciación masiva de la región ITS1 resulta útil como herramienta de diagnóstico ya que en algunos casos evidenció la presencia de forma mayoritaria de un único patógeno pulmonar.

## Bibliografía

- Alanio, A., Hauser, P. M., Lagrou, K., Melchers, W. J. G., Helweg-Larsen, J., Matos, O., ... Bretagne, S. (2016). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2386–2396. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw156>
- Aliouat-Denis, C. M., Martinez, A., Aliouat, E. M., Pottier, M., Gantois, N., & Dei-Cas, E. (2009). The *Pneumocystis* life cycle. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), 419–426. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300004>
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections, 165(13). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Calderón-sandubete, E. J., de Armas Rodriguez, Y., & Capó de Paz, V. (2011). *Pneumocystis jirovecii* : cien años de historia. *Rev Cubana Med Trop*, 63(2), 97–116.
- Calderón-Sandubete, E. J., Varela-Aguilar, J. M., Medrano-Ortega, F. J., Nieto-Guerrero, V., Respaldiza-Salas, N., de la Horra-Padilla, C., & Dei-Cas, E. (2002). Historical Perspective on *Pneumocystis carinii* Infection. *Protist*, 153(3), 303–310. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00107>
- Carmona, E. M., & Limper, A. H. (2011). Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 5(1), 41–59. <https://doi.org/10.1177/1753465810380102>
- Ciardo, D. E., Schär, G., Böttger, E. C., Altwegg, M., & Bosshard, P. P. (2006). Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 77–84. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.77-84.2006>
- Cissé, O. H., Ma, L., Huang, D. W., Khil, P. P., Dekker, J. P., Kutty, G., ... Kovacs, J. A. (2018). Comparative Population Genomics Analysis of the Mammalian Fungal Pathogen. *MBio*, 9(3), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00381-18>
- Coura, J. R. (2013). The discovery of Chagas disease (1908-1909): Great successes and certain misunderstandings and challenges. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4), 389–390. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0143-2013>
- Cushion, M. T. (2004). *Pneumocystis*: Unraveling the cloak of obscurity. *Trends in Microbiology*, 12(5), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.03.005>
- de Boer, M., Walzer, P., & Mori, S. (2018). Healthcare Related Transmission of *Pneumocystis* Pneumonia: from Key Insights towards Comprehensive Prevention. *Transplant Infectious Disease*, 0–2. <https://doi.org/10.1111/tid.12942>
- Dhami, A., & Cermakova, Z. (2015). *Pneumocystis jirovecii* : its history and emergence as a human pathogen, (January), 91–97. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000039>
- Emanuel Schmid-Siegert *et al.* (2017). Mechanisms of surface antigenic variation in the human pathogenic fungus *Pneumocystis jirovecii*. *BioRxiv*, 8(6), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01470-17>

- Flori, P., Belleste, B., Durand, F., Raberin, H., Cazorla, C., Hafid, J., ... Sung, R. T. M. (2004). Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45528-0>
- Friaza Patiño, V. (2017). Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en embarazadas y su posible implicación en la prematuridad y el aborto espontáneo. Universidad de Sevilla.
- Gaitanis, G., Magiatis, P., Hantschke, M., Bassukas, I, D., & Velegraki, A. (2012) The Malassezia Genus in Skin and Systemic Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 106-141 [Http://doi.org/10.1128/CMR.00021-11](http://doi.org/10.1128/CMR.00021-11)
- Gigliotti, F. (2005). *Pneumocystis carinii*: Has the Name Really Been Changed? *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1752–1755.
- Gigliotti, F., Limper, A. H., & Wright, T. (2014). *Pneumocystis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019828>
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015) *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, 119(9). <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.004>
- Hoving, J. C., & Kolls, J. K. (2017). New advances in understanding the host immune response to *Pneumocystis*. *Current Opinion in Microbiology*, 40, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.019>
- Huang, L. (2011). Clinical and translational research in *Pneumocystis* and *Pneumocystis* pneumonia. *Parasite (Paris, France)*, 18(1), 3–11.
- ISCH. (2016). Área de Vigilancia de VIH y Comportamientos de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Sistema De Información Sobre Nuevos Diagnósticos De VIH y Registro Nacional De Casos De Sida, 30–35. Retrieved from [https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH\\_SIDA\\_2016.pdf%0Ahttp://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH\\_SIDA\\_2016.pdf](https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2016.pdf%0Ahttp://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2016.pdf)
- Issa, N, F. Gabriel, G. Baulier, G. Mourissoux, I. Accoceberry, O. Guisset, F. Camou. (2018) Pneumocystosis and quantitative PCR, *Médecine et Maladies Infectieuses*, ISSN 0399-077X, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.04.396>.
- Iturra, P. A., Rojas, D. A., Pérez, F. J., Méndez, A., Ponce, C. A., Bonilla, P., ... Vargas, S. L. (2018). Progression of Type 2 Helper T Cell–Type Inflammation and Airway Remodeling in a Rodent Model of Naturally Acquired Subclinical Primary *Pneumocystis* Infection. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.10.019>
- Keely, S. P., & Stringer, J. R. (2009). Complexity of the MSG gene family of *Pneumocystis carinii*. *BMC Genomics*, 10, 367. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-367>

- Lawrence, S. J., Sadarangani, M., & Jacobson, K. (2017). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Case Report and Literature Review. *Frontiers in Pediatrics*. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00161>
- López-Sánchez, C., Falcó, V., Burgos, J., Navarro, J., Martín, M. T., Curran, A., ... Almirante, B. (2015). Epidemiology and Long-Term Survival in HIV-Infected Patients With *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the HAART Era. *Medicine*, 94(12), e681. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000681>
- Ma, L., Chen, Z., Huang, D. W., Kutty, G., Ishihara, M., Wang, H., ... Kovacs, J. A. (2016). Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10740>
- Ma, L., Cissé, O. H., & Kovacs, J. A. (2018). A Molecular Window into the Biology and Epidemiology of *Pneumocystis* spp. *Clinical Microbiology Review*, 31(3), 1–49.
- Maillet, M., Maubon, D., Brion, J. P., François, P., Molina, L., Stahl, J. P., ... Pavese, P. (2014). *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(3), 331–336. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1960-3>
- Misme-Aucouturier, B., Albassier, M., Alvarez-Rueda, N., & Le Pape, P. (2017) Specific Human and Candida Cellular Interactions Lead to Controlled or Persistent Infection Outcomes during Granuloma-Like Formation. *Infection and Immunity*, 85(1). E00807-16. <http://doi.org/10.1128/IAI.00807-16>
- Montes-Cano, M. A., Chabe, M., Fontillon-Alberdi, M., De La Horra, C., Respaldiza, N., Medrano, F. J., ... Calderon, E. J. (2009). Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080242>
- Morris, A., & Norris, K. A. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 297–317. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-12>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica Acta*, 439, 231-250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Peterson, J. C., & Cushion, M. T. (2005). *Pneumocystis*: Not just pneumonia. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.010>
- Rivero, L. (2015). Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- Robinson, D. P., & Klein, S. L. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis, 40(6), 1301–1315. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0452-9>. *Engineering*
- Rojas, P., Friaiza, V., García, E., De La Horra, C., Vargas, S. L., Calderón, E. J., & Pavón, A. (2017). Early acquisition of *Pneumocystis jirovecii* colonization and potential association with respiratory distress syndrome in preterm newborn infants. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/cix454>

- Rudramurthy, S. M., Sharma, M., Sharma, M., Rawat, P., Ghosh, A., V, L., ... Chakrabarti, A. (2017). Reliable differentiation of *Pneumocystis* pneumonia from *Pneumocystis* colonization by quantification of Major Surface Glycoprotein gene using real-time polymerase chain reaction. *Mycoses*. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Sanchez, C. A., Chabé, M., Aliouat, E. M., Durand-Joly, I., Gantois, N., Conseil, V., ... Vargas, S. L. (2007). Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Medical Mycology*, 45(8), 701–707. <https://doi.org/10.1080/13693780701531156>
- Skalski, J. H., Kottom, T. J., & Limper, A. H. (2015). Pathobiology of *Pneumocystis* pneumonia: Life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Research*, 15(6), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov046>
- Steinbach, W.J., Daniel K. Benjamin, J., Konotoyiannis, D.P., Perfect, J. R., Lutsar, I., Marr, K. A., ... Walsh, T. J. (2004). Infections Due to *Aspergillus terreus*: A Multicenter Retrospective Analysis of 83 Cases. *Clinical Infectious Diseases*.
- Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020096>
- Thomas, C. F. J., & Limper, A. H. (2007). Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat Rev Microbiol.*, 5(1740–1534 (Electronic)), 298–308. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1621>
- Thomas, C. F., & Limper, A. H. (2004). *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med*, 35024.
- Vera, C., Aguilar, Y. A., Vélez, L. A., & Rueda, Z. V. (2017). High transient colonization by *Pneumocystis jirovecii* between mothers and newborn. *European Journal of Pediatrics*, 176(12), 1619–1627. <https://doi.org/10.1007/s00431-017-3011-z>
- Wakefield, A., Pixley, F., Banerji, S., Sinclair, K., Moxon, E., Miller, R., & Hopkin, J. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *The Lancet Medical Science*, 336.
- Wang, X., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J., Cai, D. and Li, J. (2015), ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Mol Ecol Resour*, 15: 573-586. doi:10.1111/1755-0998.12325
- White, P. L., Backx, M., & Barnes, R. A. (2017). Diagnosis and management of *Pneumocystis jirovecii* infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.13058>